

Entwicklung und Synthese von Protease-Inhibitoren und -Modulatoren in Modellen der Alzheimer-Demenz und Tumorerkrankungen



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)


genehmigte
kumulative Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Andrea Zall
aus Hermannstadt / Rumänien

Referent:	Prof. Dr. Boris Schmidt
Korreferent:	Prof. Dr. Harald Kolmar
Tag der Einreichung:	12. März 2012
Tag der mündlichen Prüfung:	07. Mai 2012

Darmstadt 2012



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Boris Schmidt am Clemens Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt seit August 2007 angefertigt.

Danksagung

Danke:

- meinem Doktorvater Prof. Dr. B. Schmidt für die interessanten Themenstellungen, der steten Bereitschaft zur Diskussion, die nützlichen Anregungen jeglicher Art sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen.
- den aktiven Mitgliedern des Arbeitskreises für die nette Zusammenarbeit: Alexander, Azadeh, Binia, Conny, Eva, Fabio, Jiamin, Thomas, Upendra und der Sekretärin Frau Keenan.
- den ehemaligen Mitgliedern: Daniel, Hannes, Stefanie, Nicole.
- insbesondere meinen Kollegen: Daniel Kieser, Alexander Boländer, Eva Naumann, Binia Drung, Constantin Voss für die tolle gemeinsame Zeit und für Eure Freundschaft.
- Daniel und Alex für die lustigen, traurigen, motivierenden, sinnlosen, produktiven Gespräche jeglicher Art.
- Eva, Conny, Daniel und Alex für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- allen Studenten, die ich auf ihrem Weg begleiten durfte, insbesondere: Katinka, Ramona, Christoph und Dennis.
- den HiWis Johanna, Caro, Christoph und Ramona, durch die die Betreuung der Praktikas ein Stückchen angenehmer wurden.
- Dr. Karlheinz Baumann und Robert Schubnel von der Firma Hoffmann-La Roche für die erfolgreiche Zusammenarbeit.
- Dr. Stefan Lichtenthaler und Stefan Mitterreiter von der Ludwig-Maximilian Universität München für die gute Zusammenarbeit
- Prof. Dr. M. Groll und Martin Stein von der Technischen Universität München für die gute Zusammenarbeit.
- allen Mitarbeitern des Instituts, besonders Frau Rudolph aus der MS-Abteilung.
- meinen Freunden dafür, dass sie Freunde sind.
- meiner Familie, die immer an mich geglaubt hat.
- Michael, für alles.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden an folgenden Stellen vorgestellt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

- Hannes A. Braun, Andrea Zall, Manfred Brockhaus, Marco Schütz, Reinhard Meusinger and Boris Schmidt, „*Aspartic protease inhibitors via C1-homologation of peptidic aldehydes and studies on reduced amide isosteres*”, *Tetrahedron Letters* **2007**, 48, 7990-7993.
- Andrea Zall, Daniel Kieser, Nicole Höttecke, Eva C. Naumann, Binia Thomaszewski, Katrin Schneider, Dirk T. Steinbacher, Robert Schubengel, Stefan Masur, Karlheinz Baumann, Boris Schmidt, „*NSAID-derived γ secretase modulation requires an acidic moiety on the carbazole scaffold*”, *Bioorg. Med.Chem.* **2011**, 19, 4903-4909.
- Andrea Zall, Dennis Bensinger, Boris Schmidt, “*Oxidative homologation of aldehydes to α -ketoaldehydes by iodoform, IBX and dimethylsulfoxide*”, *European Journal of Organic Chemistry*, **2012**, 1439-1447.
- Andrea Zall, Stefan F. Lichtenthaler, Stefan Mitterreiter; Boris Schmidt, “*Bepiridil derivatives modulate Alzheimer`s disease associated γ secretase*”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, wird im Juni **2012** eingereicht.

Poster-Beiträge

- Boris Schmidt, Andrea Zall, Daniel Kieser, Nicole Hoettecke, Karlheinz Baumann, „*Replacement of a carboxylic acid by isosteres on a carbazolic scaffold provides γ -secretase modulators*“ Gesellschaft Deutscher Chemiker Wissenschaftsforum, 31. August - 02. September 2009, Frankfurt am Main.
- Stefanie Baumann, Nicole Höettecke, Andrea Zall, Rajeshwar Narlawar, Todd E. Golde, Karlheinz Baumann, Boris Schmidt, „*Mapping the binding site of γ -secretase modulators by small (and not so small) organic molecules*“. Gesellschaft Deutscher Chemiker Wissenschaftsforum, 31. August - 02. September 2009, Frankfurt am Main.
- Boris Schmidt, Andrea Zall, Daniel Kieser, Nicole Hoettecke, Karlheinz Baumann, „*Carboxylic acid isosteres linked on a carbazolic scaffold as γ -secretase modulators*“ ChemBioNet, 30. November – 01. Dezember 2009, Frankfurt am Main.
- Kurzvortrag und Posterpräsentation: Promotionskolloquium TU Darmstadt, „ *γ -Sekretase, ein Target zur Behandlung von Morbus Alzheimer*“, 13.07.2011, Darmstadt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	5
1.1 Die Alzheimer-Demenz	5
1.1.1 Der β -Amyloid-Vorläuferprotein Metabolismus	10
1.1.2 Aspartylproteasen	12
1.1.2.1 Die β -Sekretase als Target zur Behandlung der Alzheimer-Demenz	14
1.1.2.1 Die γ -Sekretase als Target zur Behandlung der Alzheimer-Demenz	20
1.2 Das Proteasom	29
1.2.1 Aufbau des 26S-Proteasoms	30
1.2.2 Die Proteolyse im 20S-Proteasom	32
1.2.3 Proteasom-Inhibitoren	32
1.2.3.1 Kovalent bindende Proteasom-Inhibitoren	34
1.2.3.2 Nicht-kovalent bindende Proteasom-Inhibitoren	39
2. Zielsetzung der Arbeit	41
3. Allgemeiner und kumulativer Teil der Arbeit	42
3.1 Synthese von Aspartylprotease-Inhibitoren über C₁-Homologisierung von Peptidaldehyden und Studien an reduzierten Amiden	42
3.2 Untersuchung der Bindungstasche von NSAID-abgeleiteten γ-Sekretase Modulatoren durch Derivatisierung der Seitenkette und Austausch der Carbonsäurefunktion durch Säureisostere	47
3.3 Bepiridilderivate modulieren die Alzheimer assoziierte γ-Sekretase	55
3.4 Studien zur Identifizierung der γ-Sekretase-Bindungsstelle	59
3.5 Oxidative Homologisierung von Aldehyden zu α-Ketoaldehyden unter Verwendung von Iodoform, <i>o</i>-Iodoxybenzoesäure und Dimethylsulfoxid	67
3.6 20S-Proteasom-Inhibitoren	77
3.7 Zusammenfassung	79

3.8	Ausblick	81
4.	Experimenteller Teil	84
4.1	Allgemeine Anmerkungen	84
4.2	Experimenteller Teil von „Aspartic protease inhibitors“	85
4.3	Experimenteller Teil von „<i>NSAID-derived γ-secretase modulators</i>“	88
4.4	Experimenteller Teil von “ Derivatisation of Bepriidil“	143
4.5	Experimenteller Teil des photoreaktiven biotinylierten Carbazols	161
4.6	Experimenteller Teil zu peptidischen 20S-Proteasom-Inhibitoren	172
5.	Literaturverzeichnis	176

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
A β	Amyloid- β -Peptid
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AChE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer-Demenz
AICD	cytoplasmatische Domäne
AMPN	2,2'-Azo (2-methylpropionnitril)
Äq	Äquivalente
Aph-1	<i>Anterior pharynx defective-1</i>
ApoE	Apolipoprotein
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
Ar	Aromat
BACE	<i>β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme</i>
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CatD	Cathepsin D
CH	Cyclohexan
COX	Cyclooxygenase
CSF	Rückenmarksflüssigkeit
CT	Computer-Tomographie
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropyletylamin
DIPA	Diisopropylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDAC	1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid·HCl
EE	Essigsäureethylester

EI	Elektronenstoßionisation
EOAD	<i>early onset alzheimer disease</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
ges.	gesättigt
GSI	γ -Sekretase Inhibitor
GSM	γ -Sekretase Modulator
Hex	Hexan
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol·H ₂ O
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
IC ₅₀	Konzentration des Inhibitors, welche die halbe Aktivität des Enzyms bewirkt
J	Kopplungskonstante
KP	Kernpartikel
LC	<i>liquid chromatography</i>
LOAD	<i>late onset alzheimer disease</i>
log <i>P</i>	dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten
Lsg.	Lösung
m	Multiplett
Me	Methyl
min	Minute
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>t</i> -butylether
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
Nct	Nicastrin
NFG	Nervenwachstumsfaktor
NFT	<i>neurofibrillary tangle</i>
NMDA	<i>N</i> -Methyl - <i>D</i> - Aspartat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NSAID	<i>non steroidal anti inflammatory drugs</i>
Pen-2	<i>Presenilin enhancer-2</i>

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PS	Presenilin
PyBroP	Bromo-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
RLBA	<i>radioligand binding assay</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
t	Triplett
tr.	trocken
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TMD	Transmembrandomäne
TMS	Tetramethylsilan
tPSA	<i>topological polar surface area</i>
Ub	Ubiquitin
ZNS	Zentralnervensystem
δ	chemische Verschiebung

Verzeichnis der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Demenz

Die von Alois Alzheimer 1906 entdeckte und nach ihm benannte Alzheimer-Demenz (AD) ist die am häufigsten auftretende Form von Demenz.^[1] Diese „*eigenartige Krankheit der Hirnrinde*“^[2], wie er sie nach dem Tode seiner Patientin Auguste D. beschrieb, ist eine fortschreitende neurodegenerative Demenz, die vorwiegend im Alter auftritt und mit einer irreversiblen Abnahme der Gehirn- und Gedächtnisleistung einhergeht (Abb. 01).

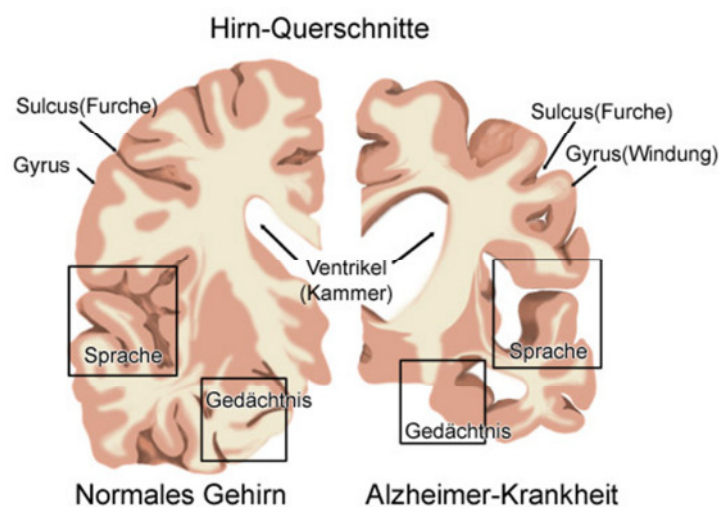


Abb. 01: Vergleich Hirnquerschnitt eines gesunden Menschen mit dem eines Alzheimer-Erkrankten.^[3]

Auch hundert Jahre später steht diese Krankheit immer noch im Fokus der medizinischen Forschung, da es bis zu dem heutigen Zeitpunkt noch keine Heilung gibt und die Krankheit immer tödlich verläuft. Im Jahre 2010 waren weltweit 35,6 Millionen Menschen von einer Demenz betroffen, in Deutschland über 1 Million. Aufgrund des demographischen Wandels und der gesteigerten Lebenserwartung wird bis 2030 mit einer Verdoppelung der Erkrankten zu rechnen sein.^[4]

Zu den Symptomen, die bei der Alzheimer-Demenz auftreten, zählen neben dem Verlust der kognitiven Leistung (Gedächtnisverlust, Desorientierung, Verwirrung) auch Verhaltensauffälligkeiten wie etwa Depression, Angstzustände, Unruhe, Schlaflosigkeit sowie Wesensveränderungen der Patienten bis hin zu dem vollständigen Verfall des Körpers und des Gedächtnisses. Die Alzheimer-Demenz ist geprägt durch zwei charakteristische pathologische Merkmale: intrazelluläre fibrilläre Bündel (*neurofibrillary tangles*, NFTs) und extrazelluläre amyloide Plaques (A β), die *post mortem* in Gehirnen von Alzheimer-Patienten gefunden werden und bis heute noch die Grundlage für die Diagnose stellen (Abb. 02).^[1, 5]

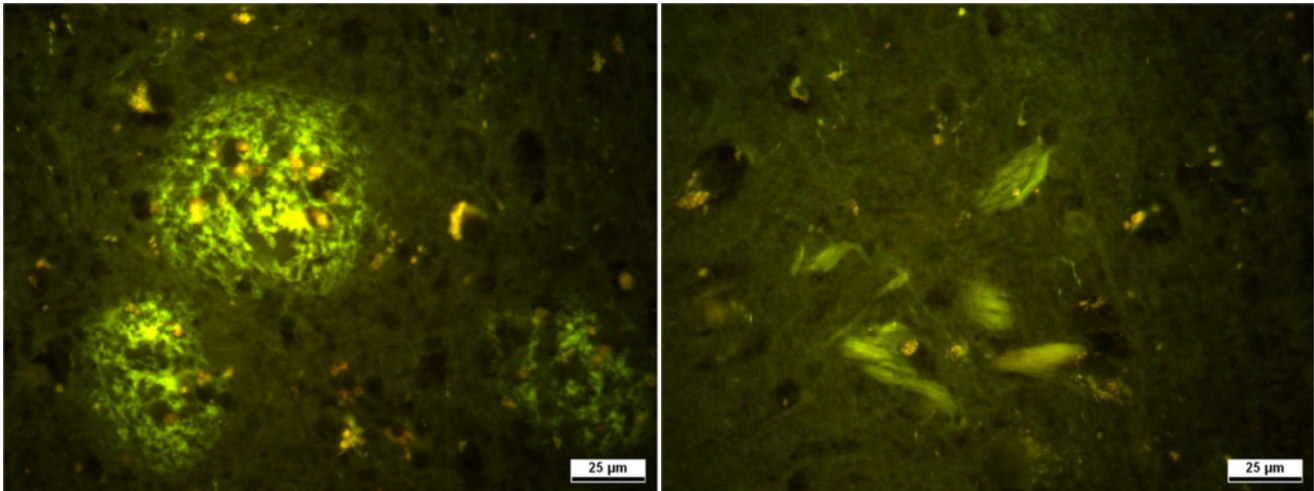


Abb. 02: Gehirnschnitt mit A β -Plaques und neurofibrillären Bündeln in der Fluoreszenzfärbung mit Thioflavin S (Gewebe: Hippocampus, Patient: männlich, Alter: 86 J, AD, Klinikum Darmstadt).

Die Bildung der neurofibrillären Bündel kann basierend auf der „Tau-Hypothese“ erklärt werden, die besagt, dass das Tau-Protein aufgrund von Ungleichgewichten in der Aktivität von Kinasen und Phosphatasen abnormal phosphoryliert wird. Die dabei gebildeten intrazellulären Bündel sind Ablagerungen des hyperphosphorylierten Tau-Proteins. In gesunden Neuronen ist normal phosphoryliertes Tau an der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt. Aufgrund der Aggregation in Folge der Hyperphosphorylierung kann Tau diese Stützfunktion nicht mehr erfüllen, was zu einer neuronalen Dysfunktion führt.^[1, 6-7]

Die Bildung der extrazellulären Plaques kann durch die Anfang der 90er Jahre aufgestellten „Amyloidhypothese“ erklärt werden, die besagt, dass die Hauptursache der AD die Akkumulation und Aggregation von Amyloid- β -Peptiden (A β) im Zentralnervensystem (ZNS) sei.^[8-9] A β besteht vor allem aus A β 42 und A β 40 und entsteht aus der proteolytischen Spaltung des β -Amyloid-Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP). A β 40 ist zwar die häufigere Spezies, jedoch ist A β 42 die hydrophobere Form und neigt verstärkt zur Aggregatbildung.^[10] Die Zwischenstufen zur Bildung der makroskopischen Plaques verlaufen über nichtfibrilläre und fibrilläre Aggregate, jedoch ist unzureichend bekannt über welchen Zeitraum sich die Plaques bilden. Die Akkumulation von A β -Peptiden bewirkt eine pathologische Kaskade, die letztendlich zu einer neuronalen Dysfunktion, dem Absterben von Neuronen, der Unterbrechung der metabolischen und ionischen Homöostase, zu oxidativem Stress und zu Veränderungen in der Aktivität von Kinasen führen (Abb. 03).

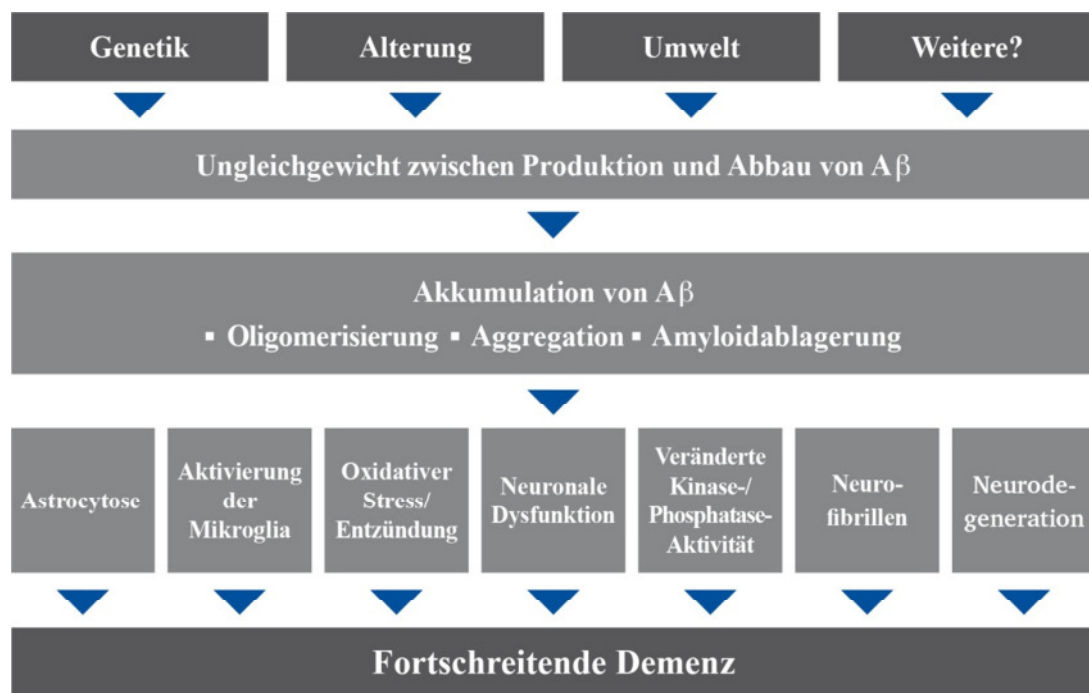


Abb. 03: Die Hypothese der Amyloidkaskade bei der AD.

Obwohl die Amyloidhypothese für die Medizinalchemie eine entscheidende Arbeitshypothese für die Entwicklung neuer Wirkstoffe darstellt um gezielt in die Bildung und Ablagerung von A β -Peptiden einzugreifen, ist sie nicht allgemein anerkannt, sondern es existieren alternative Argumente und Auffassungen.^[11-12] Als einer der Hauptkritikpunkte der Hypothese gilt das Fehlen eines quantitativen Zusammenhangs zwischen Amyloidablagerung im ZNS und der Schwere der Erkrankung.^[13-14]

Die Amyloidhypothese wurde dahingehend erweitert, dass neben den makroskopischen Plaques auch die kleineren löslichen Aggregate des A β -Peptids für die Symptome und das Fortschreiten der AD verantwortlich sind.^[15-16] Verschiedene Forschergruppen konnten in einem transgenen Mausmodell für AD zeigen, dass das Auftreten von A β -Peptidoligomeren eng mit den kognitiven Defiziten in Verhaltenstests korreliert.^[17-18]

Trotz der Defizite in der vollständigen Erklärung der AD ist die Amyloidhypothese bis heute das am weitesten verbreiteste Konzept. Sie spielt eine zentrale Rolle in der Alzheimer-Forschung, da sie das Auslösen und das Fortschreiten der Krankheit sowie die genetisch bedingten Fälle widerspiegelt. Der Erfolg neuer Medikamente, die die Amyloidbildung blockieren, werden den endgültigen Beweis oder die Widerlegung der Hypothese liefern.

Genetische Merkmale der AD. Die Ursachen der AD sind bis heute noch nicht bekannt, jedoch wurde eine Reihe von Hypothesen genetischen, toxischen, infektiösen und immunologischen Ursprungs aufgestellt. Es wird, je nach Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs, zwischen Alzheimer-

Patienten mit frühem Krankheitsausbruch (*early onset Alzheimer's disease*; EOAD) und Alzheimer-Patienten mit spätem Krankheitsausbruch (*late onset Alzheimer's disease*; LOAD) unterschieden.

Die EOAD ist die seltenere Form von AD (< 2 %), tritt bei Patienten vor dem 65 Lebensjahr auf und ist fast immer auf einen genetischen Ursprung zurückzuführen.^[19] Die Mutationen der Gene Presenilin 1 und 2 (PSEN1 und PSEN2) auf den Chromosomen 14 bzw. 1^[20] sowie das auf Chromosom 21 gelegene Gen für APP^[21] verursachen mit 100%iger Wahrscheinlichkeit AD.

Der Ausbruch der LOAD in höherem Alter ist auch mit genetischen Veranlagungen verbunden, die jedoch nur zu einem erhöhten Krankheitsrisiko beitragen, da auch noch weitere genetische Faktoren, Verhaltens- und Lebensweisen sowie Umwelteinflüsse eine Rolle spielen, die noch im Interesse aktueller Forschung stehen. Eines der identifizierten Risiko-Gene für LOAD ist die $\epsilon 4$ -Variante des Apolipoprotein E-Gens (ApoE), welches eine regulierende Rolle im Lipidmetabolismus, in der Cholesterinaufnahme und der intrazellulären Freisetzung von Cholesterin hat. Es gibt drei verschiedene ApoE Allele, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$, wobei Menschen die vermehrt $\epsilon 4$ produzieren, ein höheres Risiko besitzen, an Alzheimer-Demenz zu erkranken.^[22] Der genaue Mechanismus, wie $\epsilon 4$ Einfluss auf den Krankheitsverlauf nimmt, ist nicht geklärt. Vieles deutet darauf hin, dass $\epsilon 4$ die A β -Aggregation fördert, den oxidativen Stress erhöht und die neuronale Flexibilität beeinträchtigt.^[23]

Obwohl sich beide Formen der AD in ihrer Entstehung und Pathologie voneinander unterscheiden, so finden sich trotzdem Gemeinsamkeiten im Spätstadium: die verstärkte Sekretion von A $\beta 42$ sowie die klinischen Symptome.^[24]

Diagnose, Medikamente und neue Therapieformen. Die Diagnoseerstellung beruht heute neben den kognitiven Tests hauptsächlich auf den bildgebenden Verfahren wie der Computer-Tomographie (CT), der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT), der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und der Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (*Single Photon Emission Computed Tomography*; SPECT), die die Atrophie der betroffenen Gehirnregionen sichtbar machen oder, wie bei der PET-Diagnostik, die A β -Ablagerungen mit Hilfe von PET-Liganden markieren.^[19]

Die aktuelle medikamentöse Behandlung von AD-Patienten verfolgt verschiedene Ansätze, lindert jedoch nur die Symptome und kann das Fortschreiten der Krankheit selbst nicht stoppen.

Bei den folgenden Wirkstoffen, die in den 90er Jahren in die Klinik eingeführt wurden, handelt es sich um Acetylcholinesterase-Hemmer (AChE-Hemmer), die auf eine symptomatische Behandlung der kognitiven Störungen abzielen. Sie werden bei Patienten mit milder bis mittelschwerer AD eingesetzt. Die zugelassenen Medikamente Galantamin[®] (1), Donepezil[®] (2) und Rivastigmin[®] (3) (Abb. 04) verhindern den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin der bei Alzheimer-Patienten nicht mehr

ausreichend vorhanden ist.^[25-26] Die Behandlung ist mit starken Nebenwirkungen verbunden und die therapeutische Wirksamkeit stagniert nach einer gewissen Behandlungszeit.

Memantin[®] (4) (Abb. 04), ein nichtkompetitiver Antagonist des *N*-Methyl-*D*-Aspartat-Rezeptors (NMDA-Rezeptors), wird bei Patienten mit mittlerer bis schwerer AD eingesetzt. Er greift an den neuronenschädigenden excitotoxischen Aktivitäten im Gehirn von AD-Patienten an und blockiert die schädliche Glutamatwirkung. Die Überexpression von Glutamat führt zu einer erhöhten Kalziumkonzentration in der Zelle, wodurch permanent Kalzium-Ionen in die Zelle transportiert werden. Dadurch kann die Zelle die ankommenden Aktionspotentiale nicht mehr differenzieren, und es kommt schließlich zum Absterben von Nervenzellen.^[27] Es wird jedoch kontrovers diskutiert, ob die Einnahme des Medikamentes einen dauernden Nutzen oder zumindest eine Verzögerung des Krankheitsfortschritts bewirkt.

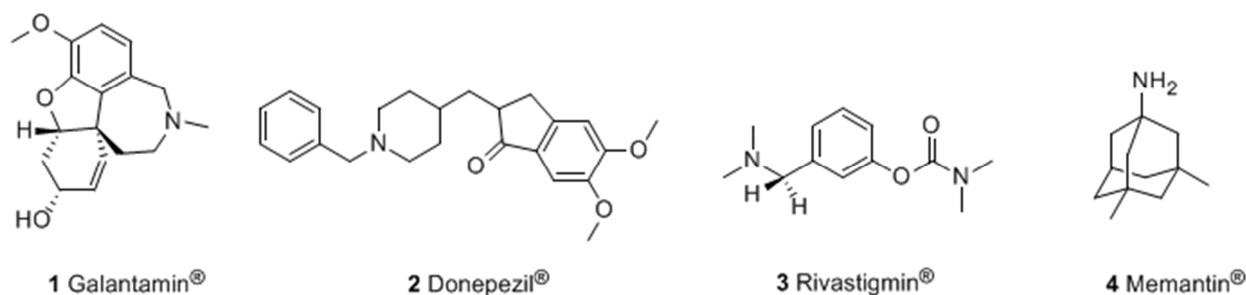


Abb. 04: Medikamente zur Symptombehandlung von AD.

Weitere Substanzklassen wurden mittels der Amyloidhypothese entwickelt. Sie greifen in verschiedene Schritte des amyloidbildenden Stoffwechselweges ein. Einige dieser entwickelten Wirkstoffe befinden sich zurzeit in der klinischen Testphase mit der Hoffnung, dass diese Ansätze den Krankheitsverlauf deutlich verzögern. Dabei werden immunotherapeutische Ansätze, Inhibitoren und Modulatoren der Sekretasen, Hemmstoffe der Amyloidaggregation und Verbindungen, die den Abbau der A β -Peptide initiieren sollen, verfolgt.^[19]

ELAN Pharmaceuticals untersuchte erstmals im Jahr 1999 an APP-transgenen Mäusen ein Konzept der Immuntherapie und verabreichte einen Impfstoff, der sich gegen das A β -Peptid durch Bildung von Antikörpern richtete. Das Konzept erschien erfolgversprechend, da sowohl bei jungen Mäusen, die noch keine Amyloidose aufwiesen, und vor allem bei älteren Mäusen, die bereits ausgeprägte Amyloidablagerungen im Gehirn entwickelt hatten, eine deutliche Verhinderung bzw. eine Reduktion dieser Plaqueablagerung beobachtet werden konnte.^[28] Diese Ergebnisse wurden in weiteren AD Mausmodellen mit unterschiedlichen Arten von A β -Impfstoffen reproduziert.^[29-30] Die anschließende Erprobung des Impfstoffs an leicht bis mittelstark betroffenen Patienten wurde in Phase II

abgebrochen, da vier der A β -Vakzin-Patienten eine aseptische Meningoencephalitis entwickelten.^[31] Trotz der auftretenden Nebenwirkungen und der noch unklaren therapeutischen Wirkung bleiben antikörperbasierte Therapien für AD ein vielversprechendes Forschungsziel.

Weitere Wirkstoffklassen die zur Behandlung von AD untersucht werden, sind Agonisten der nikotinergen und muskarinergen Rezeptoren, Antioxidantien, Aktivatoren des Neurotrophin-Signalweges und des Nervenwachstumsfaktors (NFG).^[26] Auch entzündungshemmende Medikamente wie Cyclooxygenase-1 (COX-1) oder COX-2 Inhibitoren werden auch auf ihre Wirkung gegenüber der AD untersucht, da Entzündungsvorgänge in Gehirnen von AD-Patienten beobachtet wurden.^[32]

Obwohl eine Vielzahl von therapeutischen Ansätzen in der Alzheimer-Forschung verfolgt wird und immer wieder kleine Erfolge zu verzeichnen sind, so ist es bisher noch nicht gelungen, ein wirksames Medikament zu entwickeln, welches AD endgültig heilen kann.

1.1.1 Der β -Amyloid-Vorläuferprotein Metabolismus

Die Akkumulation der pathogenen A β -Peptide, die im Gehirn von Alzheimer-Patienten zu finden sind, ist die Folge eines gestörten Metabolismus des β -Amyloid-Vorläuferprotein (APP). APP ist ein integrales Membranprotein bestehend aus 770 Aminosäuren. Es kommt hauptsächlich in drei Isoformen vor (APP695, APP751, APP770), die in verschiedenen peripheren Geweben des Organismus und im ZNS exprimiert werden.^[33] APP besteht wie alle Typ-1-Membranproteine aus einer großen extrazellulären N-terminalen Sequenz, einer Transmembrandomäne (TMD) sowie aus einer kurzen cytoplasmatischen Domäne.^[31] Die eigentliche physiologische Funktion ist längst nicht verstanden, jedoch wird diskutiert, dass die extrazelluläre Domäne eine Funktion als neurotropher Faktor aufweist, während die cytoplasmatische Domäne eine Rolle als Regulator der Gentranskription haben könnte.^[34-36]

APP wird von drei Proteasen, der α -, β - und γ -Sekretase, prozessiert. Hierbei wird zwischen dem nicht amyloidogenen Weg, der bei jedem gesunden Menschen abläuft, und dem amyloidogenen Weg, bei dem die pathologischen A β -Plaques entstehen, unterschieden. APP wird zunächst von der α -Sekretase, einer membrangebundenen Metalloprotease, über den nicht amyloidogenen Weg in der A β -Domäne geschnitten, und es entsteht das lösliche Molekül sAPP α sowie das in der Zellmembran verankerte Fragment C83. Dieses wird anschließend durch die γ -Sekretase, eine Aspartylprotease, gespalten, wobei eine intrazelluläre Domäne (AICD)^[37] und ein lösliches 3 kDa schweres Peptid (p3) freigesetzt wird.^[38] Bei dem amyloidogenen Weg wird APP zunächst von der β -Sekretase in ein membrangebundenes intrazelluläres Fragment C99 sowie in ein lösliches extrazelluläres sAPP β

Fragment gespalten. Nachfolgend wird das C99-Fragment an der Transmembrandomäne von der γ -Sekretase prozessiert und führt zur Freisetzung von A β -Oligomeren unterschiedlicher Länge (Abb. 05).^[24, 37, 39-40] Das am häufigsten vorkommende A β -Peptid ist das A β 40-Peptid (80-90%), gefolgt von A β 42 (5-10%), A β 37 und A β 38. A β 42 neigt am stärksten zur Aggregation und bildet die Grundlage für größere Oligomere und Fibrillen und schließlich für makroskopische Amyloidplaques.^[41-45]

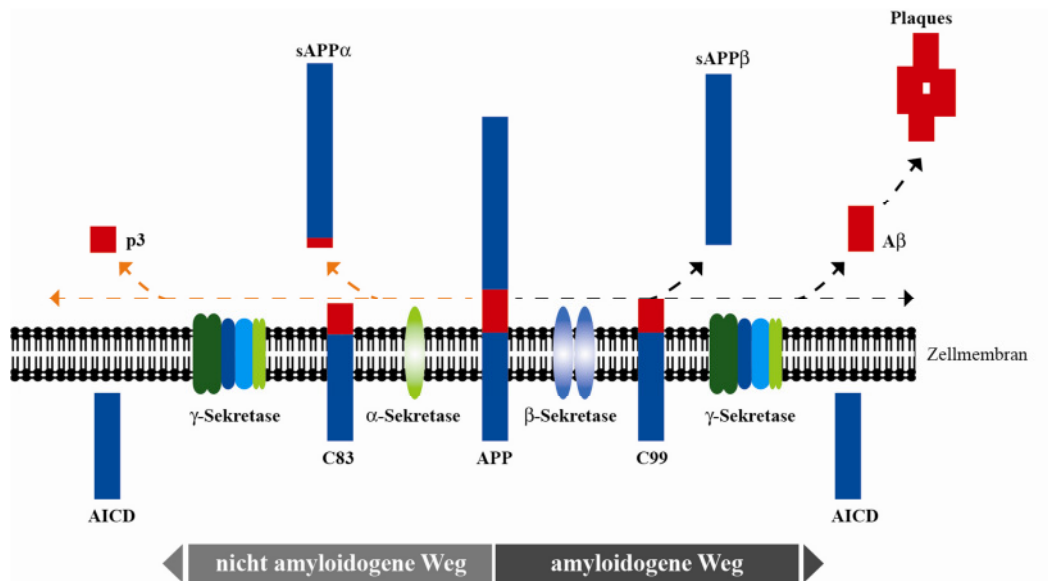


Abb. 05: Vereinfachte Darstellung des α - (rechts) und des β -Sekretase-Weges (links).

Die bisher bekannten familiären Alzheimer-Demenzen werden durch Mutationen des APP-Gens, hervorgerufen. Sie liegen alle in dem Bereich der Schnittstellen der α -, β - und der γ -Sekretase. Die schwedische Mutation (KM \rightarrow NL) ist ein Beispiel für eine aggressive Form von EOAD (Abb. 06). Diese befindet sich an der β -Sekretase-Schnittstelle und steigert deutlich die durch die β -Sekretase vermittelte Spaltung. Hierdurch wird mehr C99 generiert, was zu einer erhöhten Produktion von A β führt.^[46-48]

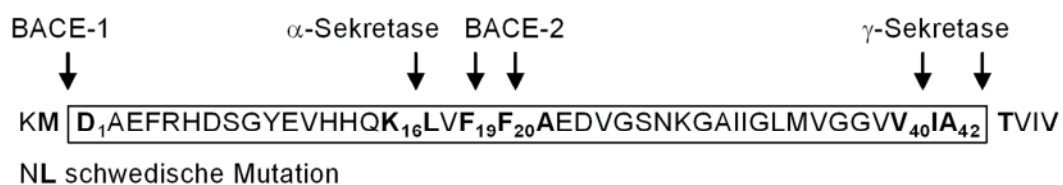


Abb. 06: Schnittstellen der α -, β - (BACE1, BACE2) und γ -Sekretase an der Sequenz von A β bzw. APP. Eingezeichnet ist auch die schwedische Mutation, die zu einer gesteigerten Spaltung in der β -Position führt. Proteolyse durch BACE1 gefolgt von der γ -Sekretase führt zum pathogenen A β (Rahmen).

1.1.2 Aspartylproteasen

Sowohl die β -Sekretase als auch die γ -Sekretase gehören zu der Klasse der Aspartylproteasen und sind für die Bildung der A β -Peptide bei der AD verantwortlich. Aspartylproteasen sind Enzyme, die in einer Vielzahl von Organismen vorkommen und einen starken Einfluss auf die biochemischen Prozesse in der Zelle ausüben, indem sie die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Allgemein sind fünf Protease-Hauptgruppen (Aspartyl-, Serin-, Cystein-, Threonin- und Metalloproteasen) bekannt, die anhand ihrer Beschaffenheit und ihres katalytischen Zentrums klassifiziert werden.^[49] Innerhalb der Aspartylproteasen sind acht Familien zu unterscheiden, von denen die Pepsin-ähnlichen mit 282 Mitgliedern und die retroviralen Proteasen mit 93 Mitgliedern die größten Familien darstellen. Die zwei β -Sekretasen BACE1 (auch ASP2 oder Memapsin 2, *β -Site APP cleaving enzyme*) und BACE2 (auch ASP2 oder Memapsin 1) gehören zu der Familie der Pepsin-ähnlichen Proteasen. Alle Vertreter dieser Familie besitzen im katalytisch aktiven Zentrum zwei hochkonservierte Aspartate (Asp32 und Asp228), mit deren Hilfe Substrate gebunden werden können. Dabei muss eine der beiden Carboxylgruppen in undissoziierter Form und die andere in ionisierter Form vorliegen. Die Katalyse lässt sich über einen Säure-Base-Mechanismus beschreiben (Abb. 07).

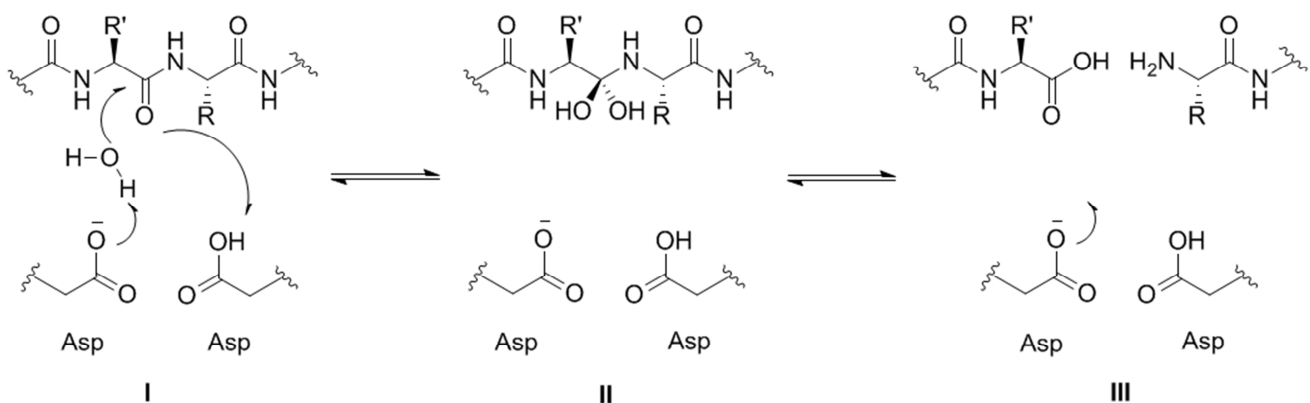


Abb. 07: Mechanismus der Proteolyse in Aspartylproteasen.

Bei der Proteolyse protoniert ein Asparaginsäure-Rest den Amid-Sauerstoff, während ein Wassermolekül durch das zweite Aspartat deprotoniert und dadurch für einen nukleophilen Angriff aktiviert wird (I). Das durch diesen konzertierten Angriff aktivierte Amid (II) unterliegt schließlich seiner Spaltung (III).

Ein weiteres Charakteristikum der Aspartylproteasen ist die in unmittelbarer Nachbarschaft zum aktiven Zentrum befindliche Deckelregion („flap-Region“). Die nahezu ausschließlich aus β -Faltblattstrukturen bestehende Domäne wird von Glycinresten umrahmt, ist frei beweglich und

drängt das Substrat in das aktive Zentrum, wo es häufig über Wasserstoffbrückenbindungen mit der *flap*-Region wechselwirkt. Das *flap* schließt nach Substratbindung und öffnet sich nach erfolgter Katalyse.^[50] Die Inhibition durch irreversibel bindende Komponenten führt zur Unterdrückung der Enzymaktivität. Die bis heute entwickelten Aspartylprotease-Inhibitoren sind reversible Inhibitoren und stehen über nicht-kovalente Bindungen (H-Brückenbindungen, Van-der-Waals) mit dem Enzym in Wechselwirkung. Die Effektivität dieser Inhibitoren hängt von der Affinität zum Enzym ab. Dabei wird bei der Entwicklung von reversiblen Inhibitoren der Ansatz verfolgt, dass die zu spaltende Bindung (*scissile bond*) durch eine vom Enzym nicht spaltbare Bindung (*non-cleavable scissile bond*) ersetzt wird. Der Vorteil dieser Übergangszustandsisostere liegt in der Hydrolysestabilität und ist vergleichbar mit der tetraedrischen Zwischenstufe bei der Hydrolyse von Amid-Bindungen (Abb. 08).^[49]

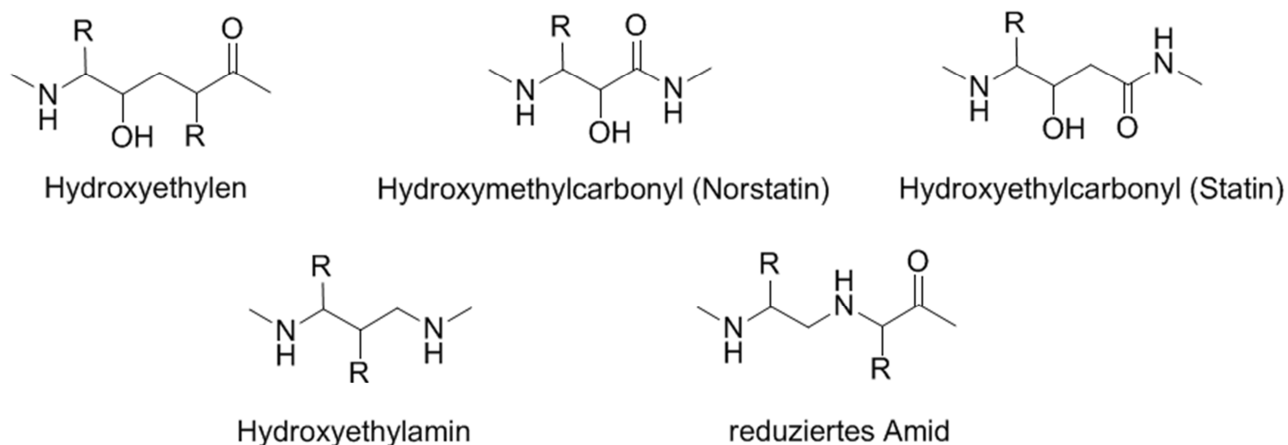


Abb. 08: Beispiele für Übergangszustandsisostere.

Die γ -Sekretase gehört zu der Familie der Presenilin-ähnlichen Enzyme. Das katalytische Zentrum wird ähnlich wie bei der β -Sekretase von zwei Aspartylresten gebildet, die sich jedoch innerhalb oder am Rande zweier Transmembrandomänen befinden und die Spaltung von membrangebundenen Proteinen innerhalb der TMD katalysieren^[51], wobei einer der Aspartylreste in das GXGD-Motiv eingebettet ist (X steht vorzugsweise für eine hydrophobe Aminosäure).^[52] Die Substrate werden ebenfalls über einen Säure-Base-Mechanismus hydrolysiert (Abb. 07). Zu dieser Familie gehören unter anderem die Preseniline^[53] und die Signalpeptidpeptidasen.^[54]

1.1.2.1 Die β -Sekretase als Target zur Behandlung der Alzheimer-Demenz

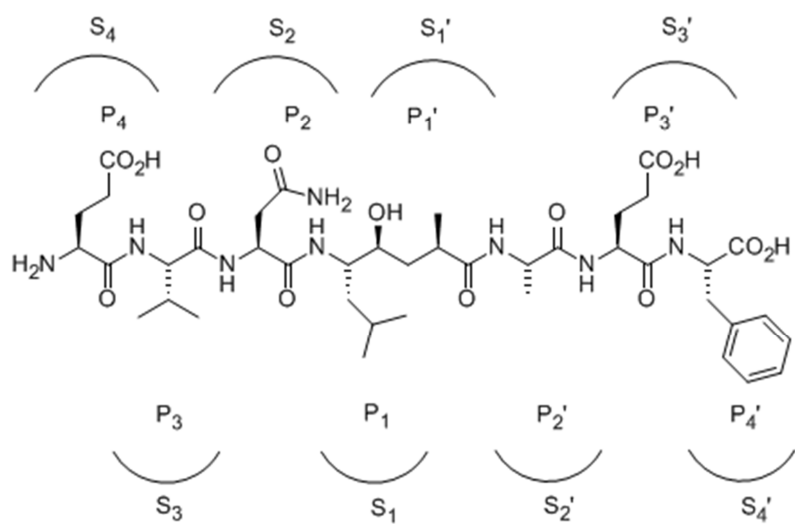
Wie schon im letzten Kapitel erwähnt, gehört die β -Sekretase zu der Gruppe der Aspartylproteasen. Die Identifizierung von BACE1 als eine der β -Sekretasen brachte in den 90er Jahren einen enormen Fortschritt für das Verständnis der Alzheimer-Krankheit.^[47, 55-58] BACE1 ist wie APP ein Typ-1-Membranprotein, wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet und ist aus 501 Aminosäuren aufgebaut.^[59] Es besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, die die zwei katalytischen Aspartate enthält, einer Transmembrandomäne und einer kurzen intrazellulären Domäne. Der N-Terminus ragt dabei in den extrazellulären Raum und der C-Terminus ins Cytoplasma. Das pH-Optimum der BACE1-Aktivität liegt im sauren Bereich (4.5 – 4.8), und es wird vermutet, dass APP in den sauren Endosomen gespalten wird.^[60] BACE1 wird hauptsächlich im ZNS exprimiert, jedoch wurde es auch in peripheren Geweben gefunden. Die genetische Inaktivierung des BACE1-Gens bei Mäusen hat zur Folge, dass die A β -Peptidbildung vollständig verhindert wird, was BACE1 zu einem vielversprechenden Target in der Alzheimer-Forschung macht.^[61] Lange Zeit galt APP als einziges Substrat für BACE1 und eine große Bandbreite an BACE1-Inhibitoren wurde synthetisiert. Die Identifizierung weiterer BACE1-Substrate (Sialyltransferase St6Gal I,^[62] P-Selectin-Glycoproteinliganden,^[63] Proteine APLP1 und APLP2,^[64] Wachstumsfaktor Neuregulin1) schränkte jedoch den therapeutischen Nutzen der Inhibitoren massiv ein. Eine vollständige Inhibierung von BACE1 führt z.B. zu einer schweren Hypomyelinierung der peripheren und zentralen Nerven in einer sich entwickelnden Maus, da die Neuregulinreifung dadurch gehemmt wird.^[65-66] Dieser Prozess ist jedoch im adulten Hirn von untergeordneter Bedeutung.

BACE2, die zweite β -Sekretase, spaltet APP an den Spaltstellen der α -Sekretase (Phe19 und Phe20) und führt nicht zu einer Bildung von A β -Peptiden.

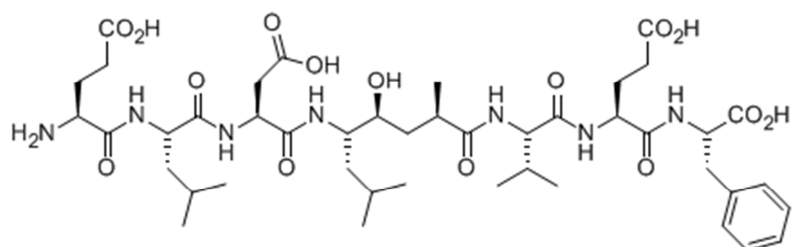
β -Sekretase-Inhibitoren. Seit der Identifizierung von BACE1 wurden intensive Bemühungen unternommen, BACE1-Inhibitoren als Therapeutika für die AD zu entwickeln. Die zu erfüllenden Kriterien waren zum einen die Selektivität bezüglich den anderen BACE1-Substraten, zum anderen die orale Verfügbarkeit, der Transport durch die Zellmembran, der Transport durch die Blut-Hirn-Schranke sowie das Molekulargewicht (< 500 kDa). Die ersten entwickelten Inhibitoren peptidischen Ursprungs erfüllten diese Anforderungen jedoch nicht. Die weitere Forschung fokussierte sich somit auf die Entwicklung nichtpeptidischer Inhibitoren. Diese verhinderten die Bildung der pathologischen A β -Peptide und verbesserten die Selektivität gegenüber den anderen Substraten.

Eine Reihe von nichtpeptidischen niedermolekularen BACE1-Inhibitoren zeigten Erfolge bei der Senkung der zerebralen A β -Spiegel in Maus-^[67-69], Hamster-^[70] und Primaten^[71]-Modellen. Darüber hinaus hat das biopharmazeutische Unternehmen CoMentis die Fertigstellung einer klinischen Phase I Studie mit einem BACE1-Inhibitor bekannt gegeben. Weitere BACE1-Inhibitor-Wirkstoffkandidaten werden demnächst für die klinische Erprobung zugelassen.^[59] Eine interessante Alternative zu niedermolekularen Inhibitoren ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, welche die enzymatische Aktivität von BACE1 inhibieren. Jüngste Berichte zeigen, dass Antikörper durchaus Potential haben, die BACE1-Spaltung von APP zu hemmen, indem sie entweder direkt an BACE1^[72] oder an die β -Sekretase Spaltstelle von APP binden.^[73]

Peptidische β -Sekretase Inhibitoren. Die peptidischen β -Sekretase-Inhibitoren der ersten Generation basieren hauptsächlich auf Strukturmotiven der Übergangszustandisostere (Hydroxyethylene, Statine, Bis-Statine, Norstatine, Hydroxyethylamine, Hydroxyethylharnstoffe). Gosh und Tang synthetisierten erstmalig zwei potente Heptapeptide OM99-2 (**5**, $K_i = 1.6 \text{ nM}$)^[74] und OM00-3 (**6**, $K_i = 0.31 \text{ nM}$)^[75] (Abb. 09) und komplexierten diese mit BACE1 (Abb. 10). Die von ihnen gewählte substratbasierte Strategie beruht auf dem Ersatz der zentralen Reste P₁/P₁' durch ein nicht hydrolysierbares „Homostatin-Isoster“. Die erfolgreiche Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse von OM99-2 mit BACE1 trieb die strukturbasierten Modifikationen weiter an, und es entstand eine Reihe von Peptid-Inhibitoren. Beide Inhibitoren sind im aktiven Zentrum lokalisiert und besitzen ein Hydroxyethylen-Zentrum, welches über vier Wasserstoffbrückenbindungen mit den zwei katalytischen Aspartaten koordiniert ist.^[20] Die Seitenketten von Leu und Val füllen die schmale hydrophobe S₃-Tasche, während der hydrophile S₂-Bereich durch die Reste der AS Asp, Asn oder Met erfüllt wird. Der S₁-Bereich bietet die geringste Variabilität, so dass viele bekannte Inhibitoren dort einen Leu-Rest, seltener einen Phe- oder Met-Rest aufweisen. Die Aminosäurereste an der P₄-Position interagieren möglicherweise mit Arg235 und Arg307 des aktiven Zentrums. Die Reste an den P₃' und P₄' Stellen gehen nur geringe Wechselwirkungen mit den S₁'- bis S₄'-Taschen des Enzyms ein, sodass diese ignoriert werden können und somit das, für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke oft zu hohe Molekulargewicht des Inhibitors herabgesetzt werden kann.^[74]



5 Tang OM99-2 ($K_i = 1.6$ nM)



6 Tang OM00-3 ($K_i = 0.31$ nM)

Abb. 09: Peptidische BACE1-Inhibitoren OM99-2 (5), OM00-3 (6).^[74-75]

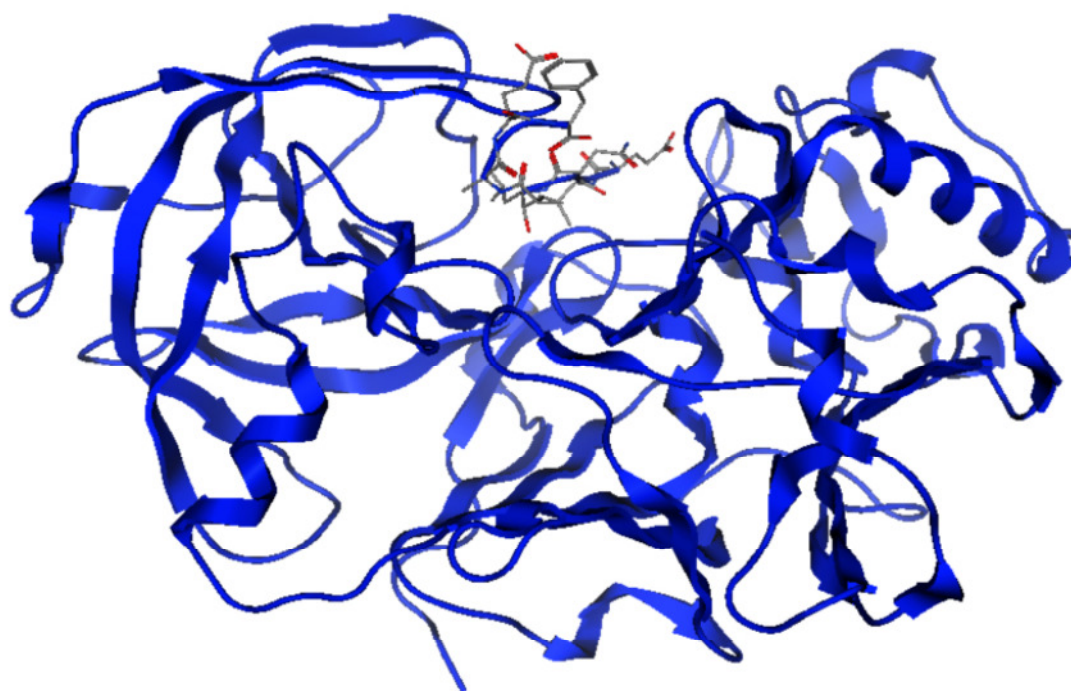


Abb. 10: Kokristallisation von BACE1 mit OM99-2 (PDB: 1FKN).

Basierend auf den Erkenntnissen von Gosh und Tang wurden weitere Peptide mit unterschiedlichen Übergangszustandsisosteren synthetisiert und auf ihre Aktivität gegenüber BACE1 getestet, jedoch zeigten diese nur mäßige Erfolge in ihrer Aktivität.^[20] Das Problem bestand hauptsächlich in der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke sowie in der oralen Bioverfügbarkeit.

Einen ersten Erfolg verzeichnete die Firma Elan Pharmaceuticals, indem sie einen Inhibitor (**7**, $IC_{50} = 200 \text{ nM}$) mit einem geringeren peptidischen Charakter entwickelte. Als Grundgerüst wurde ein Isophthalamid eingeführt, um die P_3 - und P_2 -Reste zu ersetzen. Durch die erfolgreiche Kokristallisation von Inhibitor **7** mit BACE1 konnte gezeigt werden, dass der Isophthalamid-Rest mit dem S_2/S_3 Bereich des Enzyms interagiert sowie dass der sekundäre Alkohol eine (*R*)-Konfiguration besitzt, eine Tatsache, die völlig gegensätzlich zu den bisher bekannten BACE Inhibitoren war. Das sekundäre Amin und der sekundäre Alkohol erkennen die Aspartate des aktiven Zentrums auf unübliche Weise. Das benachbarte Amin erhält wahrscheinlich ein Proton von Asp228 und platziert seinen 3-Methoxybenzylsubstituenten in die S_2' -Tasche. Eine der *N*-Propylgruppen des Isophthalamids besetzt den S_3 -Bereich und ragt in Richtung des Phenylrings, der mit der S_1 -Tasche interagiert (Abb. 11). Über 750 Analoga von Inhibitor **7** mit verschiedensten Isosterengruppen wurden synthetisiert und patentiert.^[20]

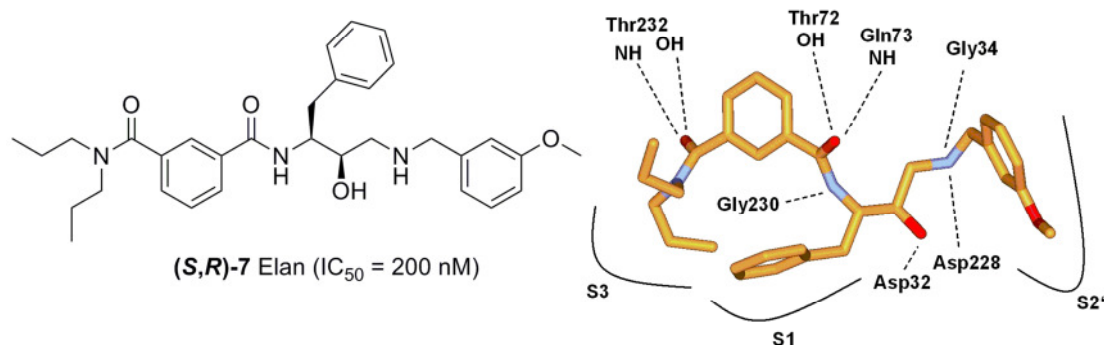


Abb. 11: Hydroxyethylamin (*S,R*)-**7** und dessen dreidimensionale Struktur in BACE (PDB: 1W51). Die Wasserstoffbrücken zum Enzym sind dargestellt. Auf eine Darstellung der Protonen wurde verzichtet.

Die Einführung eines Sulfonamids in Position 5 des Isophthalamids wie bei den Substanzen **8** und **9** füllt die noch unbesetzte S_2 -Tasche (Abb. 12).^[76]

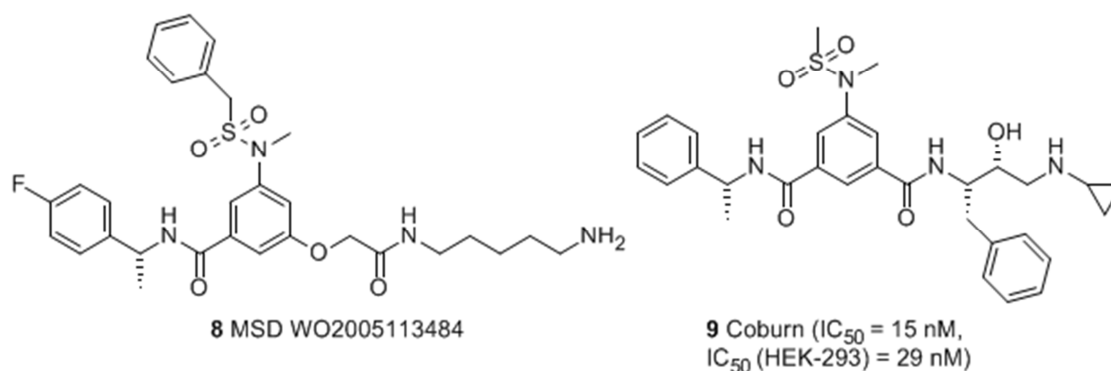
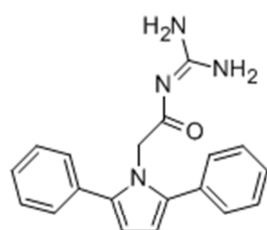


Abb. 12: Beispiele für Isophthalamid-Derivate **8** und **9** als BACE1-Inhibitoren.

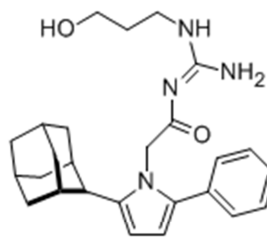
Es folgten noch eine Reihe weiterer Isophthalamid-Derivate als BACE1-Inhibitoren mit sehr guten zellfreien und zellulären Aktivitäten.^[77-79]

Nicht-peptidische β -Sekretase Inhibitoren. Eine große Anzahl von Publikationen und Patenten beschreiben Strukturen, die weitgehend unabhängig von peptidischen Inhibitoren sind. In einem *high-throughput Screening* (HTS) identifizierten Cole und Mitarbeiter (Wyeth) Acylguanidin **10** (Abb. 13).^[80] Dieses führte dazu, dass weitere Acylguanidine als neue BACE1-Inhibitoren getestet wurden. Das bemerkenswerte an **10** ist, dass der Inhibitor in der aktiven Tasche mit offenem *flap* bindet, eine Tatsache, die bei inhibitorgebundenen BACE-Kristallstrukturen noch nicht beobachtet wurde. Die zwei Phenylringe besetzen die S_1 - und S_2' -Taschen. Das Einführen eines Adamantylrestes an Stelle eines Phenylringes führte zu einer Aktivitätssteigerung. Die Kristallstrukturanalyse zeigte, dass der Adamantyl-Rest in der S_1 -Tasche liegt. Zwei der Guanidin-Stickstoffe interagieren mit den katalytischen Aspartaten, während der dritte Stickstoff in Richtung S_1' orientiert ist, aber nicht mit dieser interagiert. Die Einführung der 3-Hydroxypropylgruppe zeigte eine Interaktion mit der S_1' -Tasche und führte zu einer Erhöhung der Aktivität (**11**). Derivat **11** ist im nanomolaren Bereich aktiv (IC_{50} = 0.24 μ M) und hat eine Wirksamkeit von 1.8 μ M in dem zellbasierten Assay.

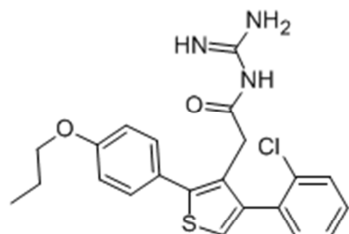
Die Verlängerung des P_1 -Restes in die S_3 -Tasche sowie die Polarisierung des P_2' -Restes und das Ersetzen des Pyrrol-Rings führte zu Verbindung **12**.^[81] Die Substitution der Guanidingruppe durch Amino-pyridin führte zu Verbindung **13**, während die oben genannten Konzepte beibehalten wurden.^[82-83]



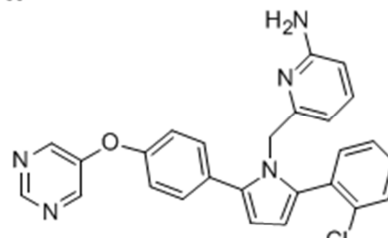
10 Cole $IC_{50} = 3.7 \mu M$,
 EC_{50} (CHO-wt) = $8.9 \mu M$



11 Cole $IC_{50} = 0.24 \mu M$,
 EC_{50} (CHO-wt) = $1.8 \mu M$



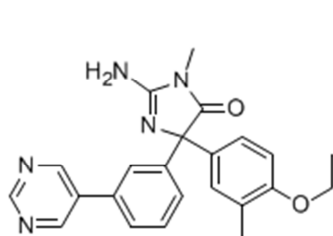
12 Wyeth US2006183792
($IC_{50} = 0.63 \mu M$)



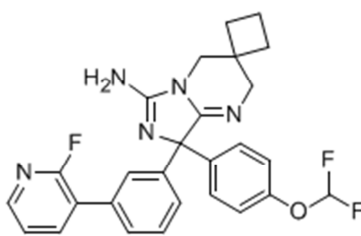
13 Wyeth US2006173049 ($IC_{50} < 0.1 \mu M$)

Abb. 13: Beispiele für Acylguanidin-BACE1 Inhibitoren und Analoga.

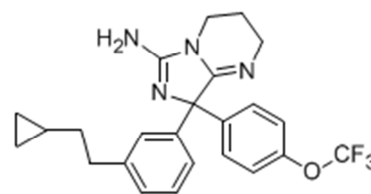
Eine neue Substanzklasse wie die Diphenylimidazolone **14**^[84] oder die Diphenylimidazopyridine **15** und **16**^[85-86], binden offensichtlich mit dem gleichen Muster an BACE1 wie die Acylguanidine und verbessern wahrscheinlich die Selektivität bezüglich BACE2 (Abb. 14).



14 Wyeth US20050282825
($IC_{50} < 0.1 \mu M$)



15 Wyeth US20050282826
($IC_{50} = 0.01 \mu M$)



16 Wyeth WO2006076284
($IC_{50} = 0.21 \mu M$)

Abb. 14: Beispiele für Acylguanidin-Derivate als BACE1-Inhibitoren.

Hoffmann-La-Roche und Schmidt et. al. entwickelten Tetram- (**17**)^[87] und Tetronsäuren (**18**)^[88] als BACE1 Inhibitoren, die in unbekannter Art und Weise an BACE1 binden (Abb. 15). Es wird angenommen, dass die Hydroxygruppe ähnlich wie die von typischen Hydroxyethylisosteren (Abb. 8) wirkt.

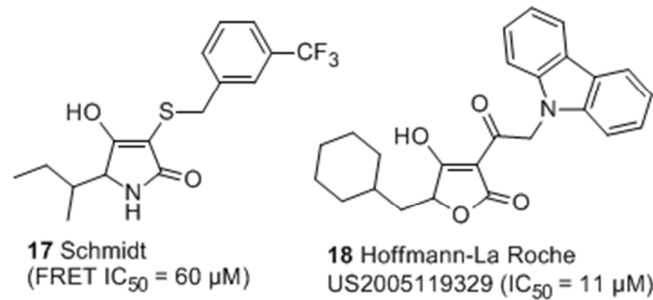


Abb. 15: Beispiele für Tetram- und Tetronsäure BACE1-Inhibitoren.

1.1.2.2 Die γ -Sekretase als Target zur Behandlung der Alzheimer-Demenz

Das durch die Spaltungsreaktion von BACE1 freigesetzte APP-Fragment C99 wird durch die γ -Sekretase weiter gespalten, und es entstehen die A β -Peptide, die in den extrazellulären Raum freigesetzt werden und die cytoplasmatische Domäne (AICD), die vom Membrananker abgespalten und ins Cytoplasma entlassen wird. Die γ -Sekretase unterscheidet sich von anderen Proteasen dadurch, dass sie ihre Substrate in der lipophilen Umgebung der TMD hydrolysiert.^[89]

Die γ -Sekretase gehört aufgrund des konservierten GXGD-Motivs zu den Signalpeptid-Peptidasen und ist ein hochmolekularer membranständiger Komplex bestehend aus mindestens vier unterschiedlichen Proteinen: Presenilin 1 und 2 (PS1 oder PS2), Nicastrin (Nct), *Anterior pharynx defective-1* (Aph-1) und *Presenilin enhancer-2* (Pen-2) im Verhältnis 1:1:1:1 (Abb. 16).^[90]

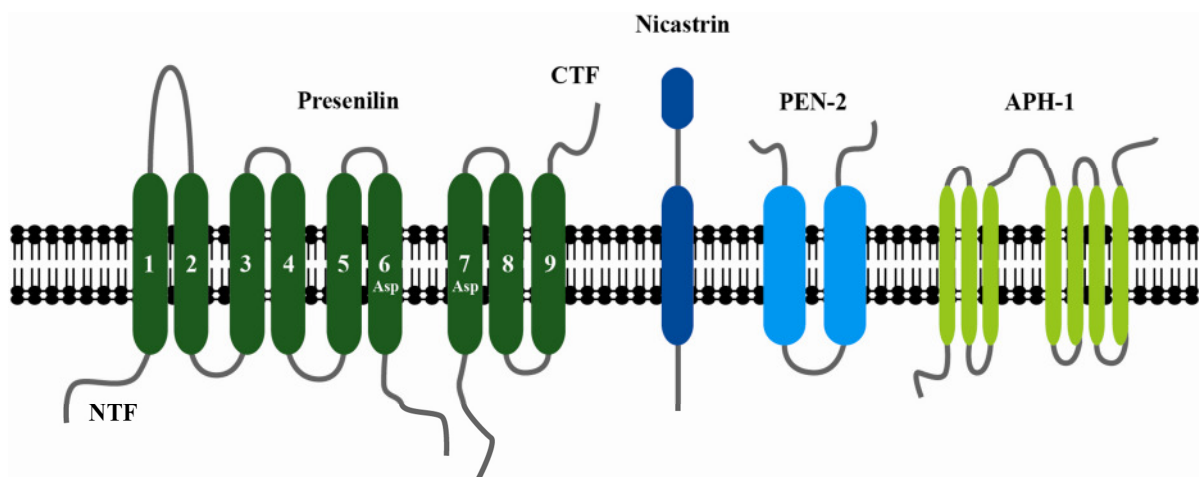


Abb. 16: Schematische Darstellung der vier wichtigen Proteine des γ -Sekretase Komplexes.

Die Preseniline 1 und 2 bilden die katalytische Untereinheit des Komplexes und sind polytopische Membranproteine mit neun TMD, die proteolytisch in ein ~30 kDa N-terminales und ~20 kDa C-terminales Fragment gespalten werden. Die Spaltung erfolgt in dem großen cytoplasmatischen Loop

zwischen der TMD 6 und TMD 7 innerhalb einer kleinen hydrophoben Domäne.^[90] Die Transmembrandomänen 6 und 7 tragen je einen Asparaginsäurerest (Asp257 und Asp385), der für die Generierung von A β verantwortlich ist, und als Homodimer aktiv sind. Wirbeltiere besitzen zwei Presenilin-Gene, nämlich PSEN1, lokalisiert auf Chromosom 14, und PSEN2, lokalisiert auf Chromosom 1. Diese enthalten jeweils die Erbinformation für PS1 und PS2. Das humane PS1 enthält 467 Aminosäuren und durch die Einführung von Glykolisierungsstellen konnten neun Transmembrandomänen identifiziert werden.^[89] Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch oder sogar der Verlust nur eines Aspartats infolge einer Mutation die Aktivität der γ -Sekretase auslöscht.^[91-92]

Nicastrin (Nct) ist ein ~110 kDa Typ-1-Membran Glycoprotein mit einer großen *N*-terminalen extrazellulären Domäne und einer kleinen intrazellulären Domäne, welche, je nach Glykosylierungsgrad, in einer „reifen“ und „unreifen“ Form vorliegen kann. Die vollständig glykosylierte Form scheint die einzige zu sein, die an Presenilin binden kann, und steht somit in Verbindung mit dem γ -Sekretase Komplex.^[93] Es wurde gezeigt, dass Nct essentiell für die Presenilin Endoproteolyse, sowie für die γ -Sekretase vermittelte Spaltung von APP und Notch ist.^[94]

Aph-1 ist ein ~30 kDa Protein, besteht aus sieben TMD, bildet mit Nct einen Subkomplex und stabilisiert das PS-Holoprotein im Komplex. Pen-2 ist ein 12 kDa Membranprotein mit zwei vermeintlichen Transmembranhelices, welche die Endoproteolyse von PS erleichtern, die resultierenden *N*-terminalen und *C*-terminalen Fragmente stabilisieren und den γ -Sekretase-Komplex anschließend aktivieren.^[93]

Ein Modell für den Mechanismus der Bildung des γ -Sekretase-Komplexes wurde von Zhou et al. vorgeschlagen. Das „unreife“ Nicastrin und Aph-1 bilden einen Unterkomplex, der in das ER eintritt und mit dem PS-Holoprotein einen dreigliedrigen Zustand bildet. Anschließend wird Nct im Golgi-Apparat vollständig glykosyliert. Durch den Eintritt von Pen-2 in den Komplex wird dieser aktiviert und es entsteht der γ -Sekretase-Komplex.^[93] Wie schon in Kapitel 1.1.2 erwähnt, ist der Spaltungsmechanismus der γ -Sekretase identisch mit dem der restlichen Aspartylproteasen (Abb. 07). Das für die Hydrolyse der Substrate in der hydrophoben Membran benötigte Wasser wird von den TMD 6 und 7 geliefert.^[89] Zwei Forschergruppen haben bestätigt, dass die TMD 6 und 7 einen hydrophilen Hohlraum enthalten, in dem die zwei katalytischen Aspartate in Nachbarschaft zueinander stehen.^[95-97]

Im Laufe der Jahre wurden weitere Proteine identifiziert, die mit dem γ -Sekretase-Komplex in Verbindung stehen, z.B. das Membranprotein CD147, welches eine Regulatorfunktion besitzt, sowie GSK3, Phospholipase D1 (PLD1) und das Transmembranprotein 21 (TMP21).^[93]

Der γ -Sekretase-Komplex ist in den meisten Geweben des Organismus lokalisiert, so dass er nicht nur die Spaltung des APP-C99-Fragments katalysiert, sondern auch bei weiteren Substraten eine tragende Rolle spielt. Hierzu gehören unter anderem die Rezeptoren APLP1 und 2, die Notch-Rezeptoren 1-4, die Notch-Liganden Jagged und Delta, die Rezeptoren CD44 und LDL. Es werden fortlaufend neue potentielle Substrate identifiziert, die eines gemeinsam haben: die Abspaltung der extrazellulären Domäne vor dem Prozessieren der γ -Sekretase.^[19]

Die am besten charakterisierten Substrate sind die Notch-Rezeptoren, die nach Bindung der Liganden Jagged und Delta ihre extrazelluläre Domäne abspalten, um dann von der γ -Sekretase weiter prozessiert zu werden. Die intrazelluläre Domäne von Notch wird durch die γ -Sekretasespaltung freigesetzt, wandert in den Kern, um dort als Transkriptionsregulator zu fungieren. Die Notch-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Haut- und Darmepithelien, der B- und T-Zellentwicklung und bei anderen Geweben, die bei der Embryonalentwicklung und im adulten Körper einer ständigen Proliferation und Differenzierung unterliegen. Eine Abschwächung des Notch-Signals durch Inhibition der γ -Sekretase kann die Homöostase dieser Gewebe ernsthaft beeinträchtigen.^[19]

Die γ -Spaltung, die die A β -Peptide unterschiedlicher Länge freisetzt, ist nicht sequenzspezifisch und erfolgt in der Mitte der Transmembrandomäne des APP. Die ϵ -Spaltung, ein vorgeschalteter (oder nebeneinander) proteolytischer Schnitt an der Grenze zwischen TMD und Cytoplasma, setzt die cytoplasmatische Domäne des APPs frei. Ein ähnliches Spaltmuster konnte bei anderen γ -Sekretase-Substraten wie Notch 1 und CD44 nachgewiesen werden.^[95, 98]

γ -Sekretase-Inhibitoren und -Modulatoren. Ein zweiter potentieller Therapieansatz, die Ursachen der AD zu lindern, besteht neben der Inhibition der β -Sekretase in der Inhibition der γ -Sekretase, was eine Reduktion der A β -Peptide bewirken würde. Der Nachteil der vollständigen Inhibition besteht jedoch in den möglichen Nebenwirkungen, die durch die Prozessierung weiterer wichtiger Substrate der γ -Sekretase auftreten können, z.B. des Notch-Stoffwechselweges. Dennoch wurden in der Vergangenheit eine große Anzahl von potenten γ -Sekretase-Inhibitoren (GSIs) unterschiedlicher Struktur gefunden, und einige Verbindungen sind bis in die klinische Testphase weiterentwickelt worden. Da es bis heute noch nicht gelungen ist eine Röntgenstrukturanalyse des γ -Sekretase Komplexes zu erhalten, basieren die meisten entwickelten Leitstrukturen auf Aktivitäten die bei der Durchführung von zellfreien Tests auf der Basis teilgereinigter Membranpräparationen und rekombinantem C99 als Substrat sowie in HTS-Verfahren gefunden wurden.^[19, 98]

In den letzten Jahren hat sich der Fokus auf die Entwicklung von γ -Sekretase-Modulatoren (GSMs) verschoben. GSMs sind Verbindungen, die den relativen Anteil der A β -Isoformen unter Erhalt der Sekretasefunktion ändern.

γ -Sekretase-Inhibitoren können, abhängig davon wie sie an den γ -Sekretase-Komplex binden, in drei Untergruppen unterteilt werden: a) GSIs, die an das aktive Zentrum (*active site*) binden, b) GSIs, die an das Substrat binden (*substrate docking-site-binding*) und c) GSIs mit alternativer Bindungsstelle (*alternative binding site*), die wiederum weiter in carboxamidische und arylsulfonamidische GSIs unterteilt werden können.^[89] Die erste Generation von GSIs zeigte unerwünschte Nebenwirkungen, die auf die Inhibition von Notch, prozessiert durch die γ -Sekretase, zurückzuführen sind. Diese Nebenwirkungen bestanden in den Störungen der natürlichen Reifung der B- und T-Lymphozyten, was zu einer Magen-Darm-Toxizität und zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen führte.^[99-101] Der erste γ -Sekretase-Inhibitor mit einer *in vivo* Wirksamkeit ist die semi-peptidische Verbindung DAPT (**19**, Abb. 17) von ELAN/Eli Lilly. Die subkutane Verabreichung von DAPT zeigte *in vivo* eine robuste Wirksamkeit in tg2576 Mausmodellen. In jungen tg2576 Mäusen vor der Plaque-Bildung wurde berichtet, dass DAPT den A β -Gehalt im Plasma und Cortex dosisabhängig reduziert. Bei älteren tg2576 Mäusen (17 Monate), die bereits unlösliche A β -Aggregate ausgebildet hatten, reduziert DAPT ebenfalls den A β -Gehalt in der Rückenmarksflüssigkeit (CSF) und im Plasma, jedoch nicht im Gehirn, wo die A β Konzentration 400 - 500 mal höher ist als bei jungen Mäusen. Die akute Behandlung mit DAPT hat ebenfalls gezeigt, dass die kognitive Funktion von tg2576 Mäusen verbessert werden konnte.^[101] In einer vorklinischen Studie wurde jedoch nachgewiesen, dass DAPT in hohem Maße den Notch-Signalweg beeinträchtigt (100 - 1000 mal stärker), was zu einer hohen Toxizität *in vivo* führt.^[102-103] LY-411575 (**20**, Abb. 17) ist eine weitere potente Verbindung von Eli Lilly, die vielfach für *in vivo* Studien der γ -Sekretasehemmung eingesetzt wurde. In pharmakodynamischen Studien an tg2576 Mäusen konnte gezeigt werden, dass Verbindung **20** nach einmaliger oraler Verabreichung von 0.1 - 10 mg / kg die A β 40- und A β 42-Spiegel im Plasma, Hippocampus, CSF und Cortex reduziert.^[104] In einer separaten chronischen Behandlung von transgenen Mäusen mit **20** tritt neben der Reduktion des A β -Niveaus auch eine Thymusatrophie auf, welche in Zusammenhang mit der Inhibition des Notch-Signalweges gebracht werden kann.^[100] Eine weitere Verbindung von Eli Lilly ist LY-450139 (**21**), mit der eine Phase I- und Phase II-Studie abgeschlossen wurde. Sie zeigt eine deutlich geringere Aktivität als Verbindung **20**, weist allerdings eine höhere Selektivität gegenüber der APP-Spaltung auf. In Phase II wurden 17 Patienten 30 mg / Tag eine Woche lang verabreicht, anschließend 40 mg/Tag 5 Wochen lang. Verbindung **21** wurde toleriert und A β 40 wurde um 38% im Plasma reduziert. Weiterhin konnten keine signifikanten Veränderungen von A β im CSF

beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass Substanz **21** bei der verabreichten Menge keine Wirkung auf die Erniedrigung der A β -Level im Gehirn zeigt. In dieser Studie wurden auch keine sichtbaren Notch-bedingten unerwünschten Nebenwirkungen beobachtet.^[101] Auch in Phase III zeigte **21** keine nennenswerten Selektivitäten gegenüber der Notch-Inhibition. Eli Lilly kündigte jedoch an, dass sie die Entwicklung von **21** aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse aus zwei Phase III Langzeitstudien gestoppt haben. Die Ergebnisse zeigten im Vergleich zum Placebo einen Rückgang in den kognitiven Eigenschaften sowie in der Fähigkeit, die tägliche Arbeit zu erfüllen. Darüber hinaus wurde **21** mit einem erhöhten Risiko für Hautkrebs in Verbindung gebracht, was eventuell doch auf die Prozessierung von Notch zurückzuführen ist.^[89]

Die Verbindung BMS-299897 (**22**, Abb. 17) wurde von einer Gruppe bei Bristol-Myers Squibb entwickelt und zeigt ebenfalls eine Abnahme von A β im Plasma, CSF und in den Gehirnen von transgenen Mäusen mit überexprimiertem humanem APP. In jungen transgenen Mäusen ist die A β Abnahme dosis- und zeitabhängig, mit einer guten Korrelation zwischen den Veränderungen im CSF und Gehirn. Bei älteren Mäusen mit einem erhöhten A β -Level wurde eine Reduktion von A β erst nach zwei Wochen Behandlung im CSF, allerdings nicht im Gehirn, beobachtet. In zellulären Tests erbrachte **22** eine 15-fach höhere Affinität für APP gegenüber Notch. Auch in einer zweiwöchigen Studie mit Dosen, die zur Absenkung von A β im Gehirn ausreichen, wurden keine Nebenwirkungen beobachtet die mit Notch in Verbindung stehen.^[101]

MRK-560 (**23**, Abb. 17) wurde von Merck publiziert und ist ein potenter, oral verfügbarer, selektiver und gehirngängiger Inhibitor. Im Rattenmodell wurde der A β -Spiegel im Gehirn und CSF reduziert. Die Behandlung von tg2576 Mäusen mit 3 mg / kg von **23** verringerte das A β -Peptid und die Amyloidbelastung im Gehirn ohne Anzeichen einer Hemmung von Notch in Darm, Milz oder Thymus.^[101]

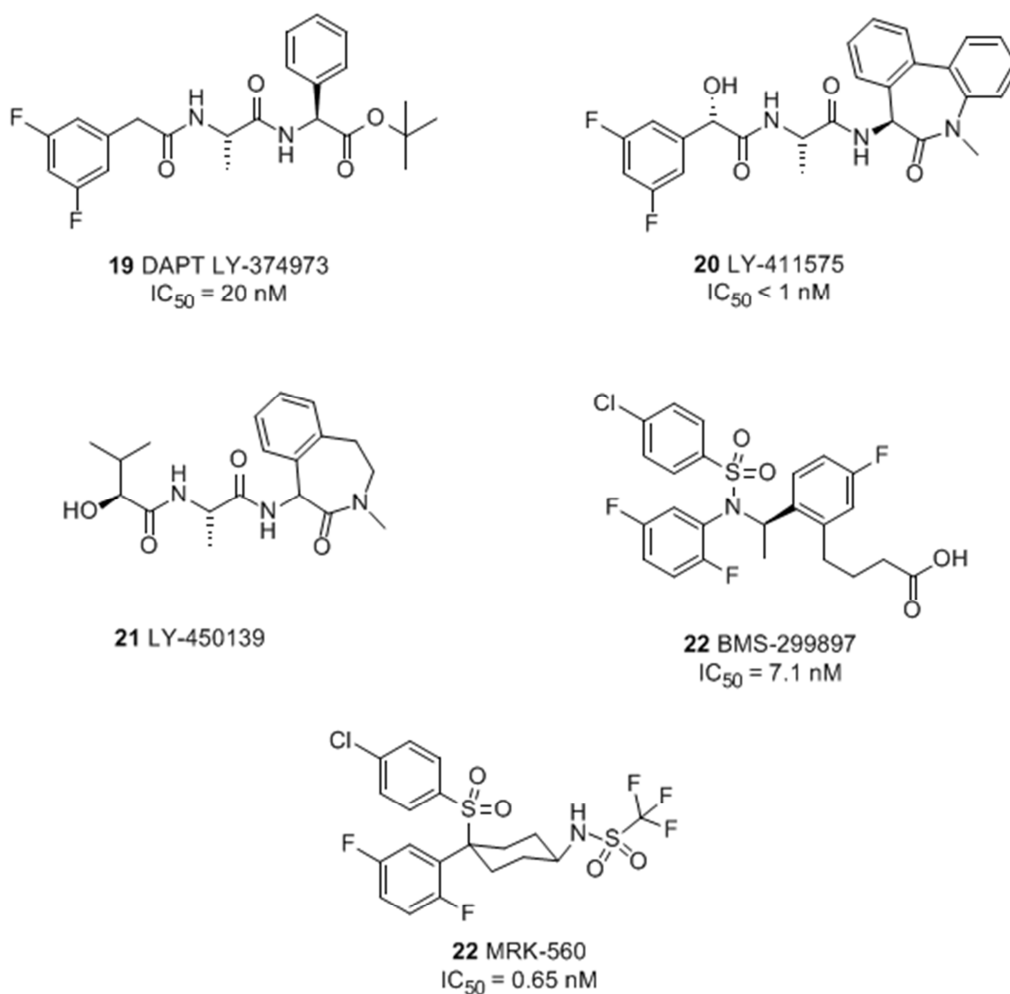


Abb. 17: Auswahl an γ -Sekretase-Inhibitoren.

Zwei weitere γ -Sekretase-Inhibitoren MRK-0572 und GSI-953 ($IC_{50} = 18 \text{ nM}$) befinden sich in der Phase I Studie. Von beiden Substanzen wurde die Struktur bislang nicht veröffentlicht, jedoch zeigen beide wirksame und selektive Eigenschaften gegenüber der Inhibition der γ -Sekretase.^[101]

γ -Sekretase-Modulatoren zählen heute zu den vielversprechendsten Ansätzen in der Behandlung der AD basierend auf den Erkenntnissen der Amyloidhypothese. Der Vorteil der Modulatoren besteht darin, die Prozessierung der γ -Sekretase zu kleineren Fragmenten zu verschieben, wobei die A β -Gesamtkonzentration unverändert bleibt.

Epidemiologische Studien in der Vergangenheit haben gezeigt, dass Rheuma-Patienten, die regelmäßig entzündungshemmende Wirkstoffe, sogenannte nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs, *non steroidal anti inflammatory drugs*), einnehmen ein reduziertes Risiko besitzen, an AD zu erkranken.^[105] Da bei AD-Patienten Entzündungsvorgänge im Gehirn beobachtet wurden^[106] und einige Wissenschaftler dieses als ein Auslöser der AD ansehen^[107], liegt der Ansatz nahe, AD-Patienten mit NSAIDs zu behandeln.

Die erste Generation von GSMs auf Basis dieser NSAIDs wurde 2001 von Weggen et al. publiziert.^[108] Dabei wurden NSAIDs, wie Sulindac Sulfid (**24**), Indomethacin (**25**), Ibuprofen (**26**), Naproxen (**27**) und Aspirin (**28**), *R*-Flurbiprofen (**29**) (Abb. 18) auf ihre γ -Sekretase-Aktivität untersucht. Es konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass die A β ₄₂-Konzentration abnahm, A β ₄₀ unverändert blieb, während das pathologisch unbedenkliche A β ₃₈ zunahm, wobei Naproxen (**27**) und Aspirin (**28**) die A β -Bildung gar nicht beeinflussten. Es konnte auch gezeigt werden, dass die NSAID-abgeleiteten GSMs selektiv den APP-Abbau der γ -Sekretase inhibieren, während die Hemmung der ϵ -Spaltung ausbleibt, wodurch der Notch-Signalweg nicht betroffen wird.^[109] Im Gegensatz dazu erhöhen Fenofibrat (**30**), ein Peroxisom-Proliferator aktivierter Rezeptor Antagonist (PPAR), und Celecoxib (**31**), ein Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Inhibitor, selektiv die A β ₄₂-Konzentration und sind demnach inverse GSM.^[110-111]

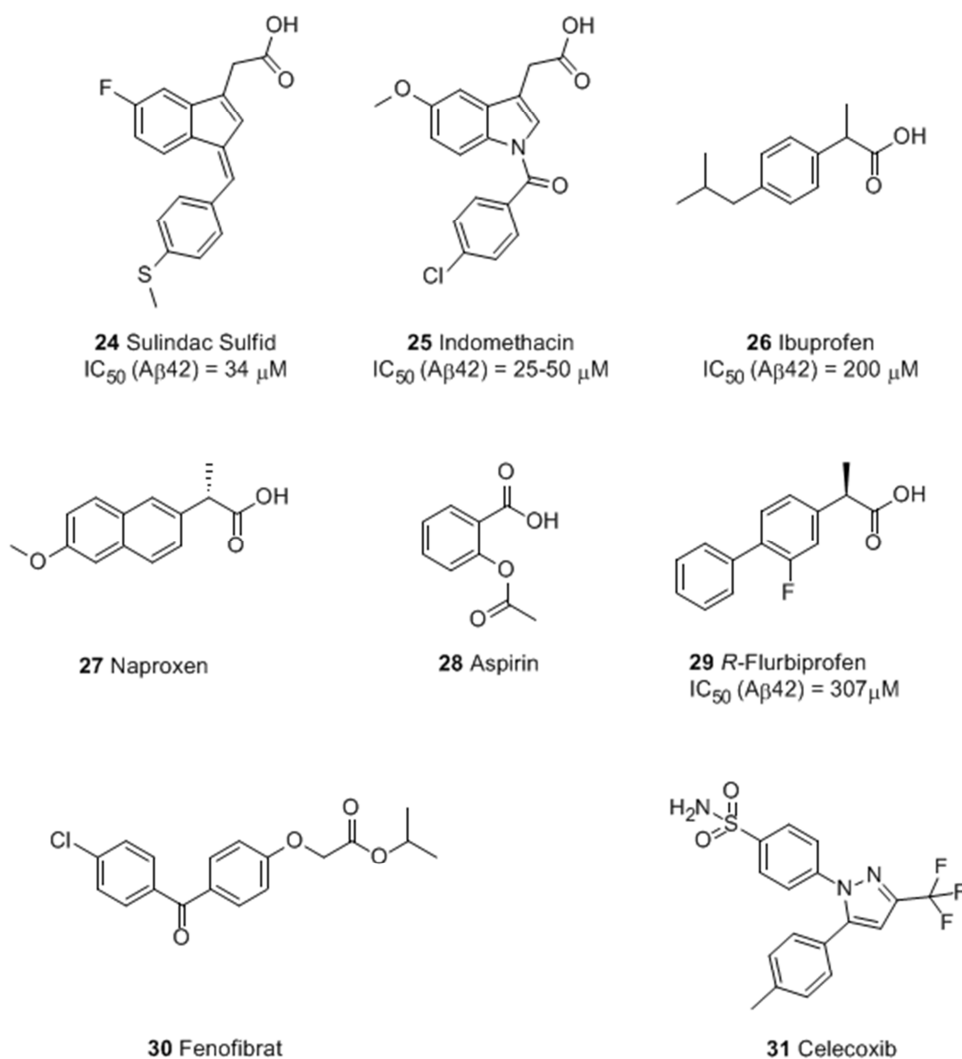


Abb. 18: Beispiele für NSAIDs mit modulatorischer Wirkung (**24**, **25**, **26**, **29**, **30**, **31**) und NSAIDs ohne modulatorische Wirkung (**27**, **28**).

Eine klinische Phase III Studie mit *R*-Flurbiprofen (**29**, Flurizan[®]) von Myriad Pharmaceuticals endete 2008 wegen mangelnder Wirksamkeit.^[112]

Der selektive GSM (**32**) wurde 2005 von Merck Sharp & Dohme patentiert.^[113] Auffallend an diesem Modulator war wie bei den NSAIDs die vorhandene freie Carbonsäure, die für die Verschiebung der A β -Schnittstelle und somit für die A β 40/42/38 Verhältnisse notwendig zu sein scheint. Weitere Beispiele von GSMs mit einem Carbonsäuremotiv **33** und **34** bestätigten deren Notwendigkeit.^[114-115]

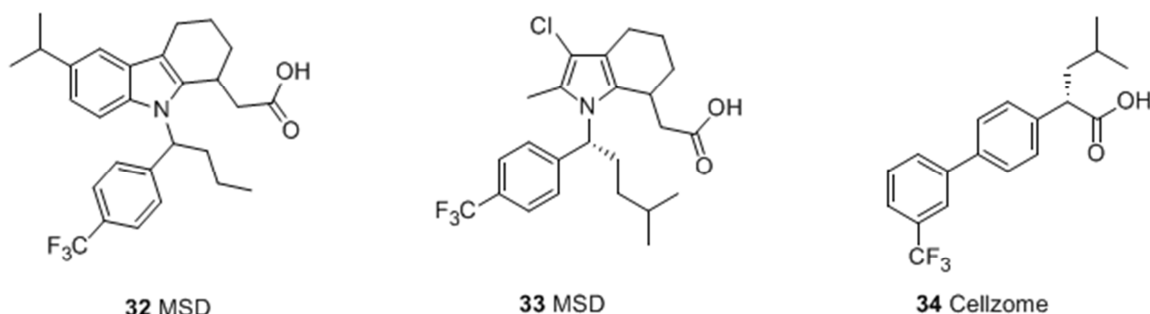


Abb. 19: Beispiele für GSMs mit einer freien Carbonsäure.

Schmidt et al. entwickelte GSMs basierend auf dem Grundgerüst des Carprofens (**35**).^[116] Substanz **35** ist ein bekannter COX-2-Inhibitor und weist eine schwache γ -Sekretase-Inhibition auf. Durch die Einführung von lipophilen Substituenten, wie Sulfonyl- oder Alkylreste, sowie durch das Einführen von elektronenschiebenden Gruppen konnte eine modulatorische Wirkung mit Aktivitäten im unteren mikromolaren Bereich erzielt werden (**36**, **37**). Die Säurefunktionalität ist für die Interaktion mit Lysin des Substrates APP wichtig (wahrscheinlich mit Lys624), während der lipophile Rest für eine räumliche Orientierung in der Membran verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Verbindungen nur einen geringen oder gar keinen Einfluss auf die γ -Sekretase-Spaltung der ϵ -Schnittstelle haben. Des Weiteren konnte dieses Prinzip auch auf achirale Carbazolderivate wie z.B. **38** übertragen werden.^[117-118]

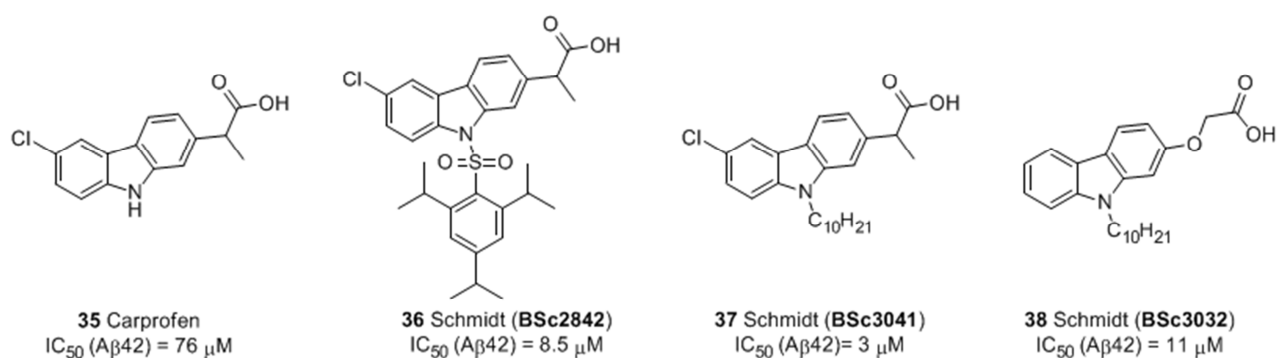


Abb. 20: Beispiele für GSMs von Schmidt et al..

Obwohl die genauen molekularen Mechanismen der γ -Sekretase-Modulation noch unklar sind, geben einige Studien von NSAIDs abgeleiteten GSMs Hinweise auf die molekularen Wechselwirkungen mit dem γ -Sekretase-Komplex. NSAIDs und deren potentere Carbonsäurederivate zeigen eine Reduktion von A β 42 in zellfreien und zum Teil gereinigten γ -Sekretase Präparaten.^[109, 119-120] Seitdem haben sich zwei wesentliche Hypothesen, die *Enzym-Targeting* und die *Substrat-Targeting* Hypothese, entwickelt, um die Wirkung von GSMs zu erklären. Das *Enzym-Targeting* basiert auf der Interaktion der Substanzen mit der γ -Sekretase, und es konnte nachgewiesen werden, dass GSMs mit Presenilin über einen allosterischen Mechanismus interagieren, was zu einer Modifizierung der Enzymkonformation führt.^[121-123] Die zweite Hypothese, das *Substrat-Targeting*, basiert auf Photoaffinitätsstudien mit biotinylierten GSM-Photoproben (*R*-Flurbiprofen und Fenofibrat), die belegen, dass diese APP und seine C-terminalen Derivate (APP-CTFs, A β) markieren.^[124] Die Schlussfolgerung daraus ist, dass die γ -Sekretase indirekt über *Substrat-Targeting* moduliert wird.

Multhaup *et al.* konnten zeigen, dass APP Dimere über Gly29 und Gly32, ein GxxxG-Motiv bilden und durch diese sterische Barriere die Spaltung durch die γ -Sekretase zu dem pathologischen A β 42 verschoben wird. Mutationen der beiden Glycine zu Asparagin, G29A und G32A, zeigen eine normale Spaltung von APP zu A β 38.^[125-126] Ebenso wurde gezeigt, dass die APP-Dimere durch die NSAIDs Sulindac Sulfid (**24**) und Indomethacin (**25**) in einer konzentrationsabhängigen Weise destabilisiert werden und direkt an die A β -Sequenz binden.^[127] In einer weiteren neuen Mutationsstudie über APP wurde die *APP-Substrat-Targeting* Hypothese der GSMs in Frage gestellt. Diese Mutationsstudien zeigten keine Auswirkung auf A β 42 nach Behandlung mit GSMs, sondern eine Zunahme von A β 38, was nahe legt, dass A β 38 und A β 42 nicht voneinander abhängig sind.^[120, 128]

1.2 Das Proteasom

Krebserkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt und gehören zu den Krankheiten mit den höchsten Kosten in der Behandlung. Laut *Union for International Control* (UICC) werden jährlich bei über 12,7 Millionen Menschen Krebserkrankungen diagnostiziert; 7,6 Millionen der Patienten sterben an den Folgen dieser Erkrankung. Daher besteht großes Interesse sowohl bei staatlichen Forschungseinrichtungen als auch in der pharmazeutischen Industrie, geeignete Wirkstoffe zu entwickeln, die eine Behandlung von Krebserkrankungen möglich machen oder die Lebensqualität der Patienten verbessert.^[129]

Ein vielversprechendes Target für die Behandlung von Krebs ist, neben den Kinasen^[130], das Proteasom. Das Proteasom ist eine Threoninprotease und spielt eine entscheidende Rolle in zellulären Prozessen, wie dem Abbau von mutierten und fehlgefalteten Proteinen, der Kontrolle des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung, der Proliferation sowie der Apoptose.^[129] Eine gezielte Inhibition des Proteasoms würde demzufolge zur Anhäufung der zum Abbau vorgesehenen Proteine und letztendlich zur Apoptose der Zelle führen. Durch seine zentrale Rolle im intrazellulären Proteinabbau wird auch ein Zusammenhang mit weiteren Krankheiten wie neurodegenerative Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Entzündungserkrankungen vermutet.

Der intrazelluläre Proteinabbau verläuft entweder über die Lysosome oder über das zytosolische Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).^[131]

Das Ubiquitin-Proteasom-System setzt sich aus vielen einzelnen Schritten zusammen, erkennt selektiv spezifische Substrate, markiert sie und baut sie anschließend ab.^[132-133] Ubiquitin (Ub) ist ein Protein bestehend aus 76 Aminosäuren (8.5 kDa) und in allen eukaryotischen Zellen zu finden. Die Ubiquitinylierung wird von drei Enzymen E1 (Modifikation aktivierendes Enzym), E2 (Modifikation konjugierendes Enzym) und E3 (E3-Ligase) katalysiert. Zunächst wird Ubiquitin in einem ATP-abhängigen Prozess an das Enzym E1 gebunden und aktiviert. Anschließend wird Ubiquitin an das Enzym E2 überführt, um dann vom Enzym E3 auf das Zielprotein übertragen zu werden. Einige Zielproteine werden nach dem gleichen Mechanismus nach ihrer Monoubiquitinylierung polyubiquitinyliert, da es für deren Abbau essentiell ist. Das ubiquitinylierte Protein wird nun von dem 26S-Proteasom Komplex erkannt und unter ATP-Verbrauch abgebaut (Abb. 21).

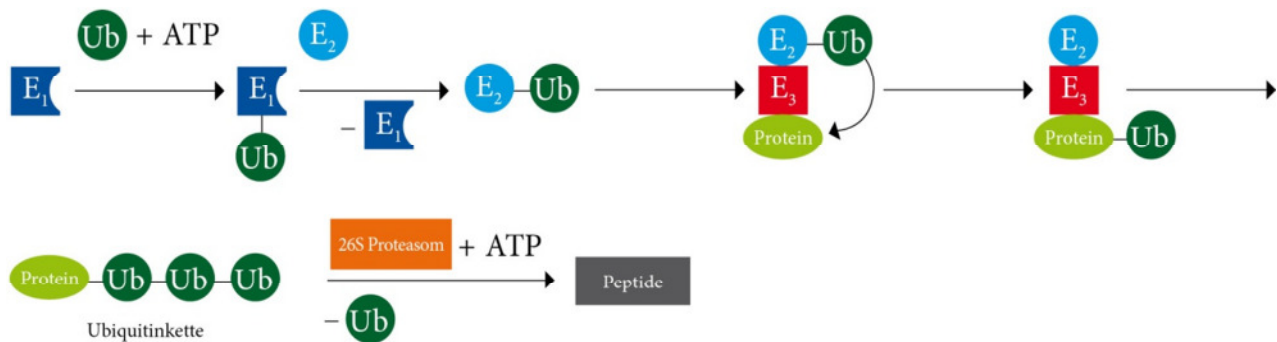


Abb. 21: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom Systems.

1.2.1 Aufbau des 26S-Proteasoms

Als zentrale Protease in dem Ubiquitin-Proteasom-System spielt das 26S-Proteasom eine wesentliche Rolle bei dem Proteinumsatz der Zelle. Weiterhin gilt das Proteasom als wichtiges Instrument zum nicht-lysosomalen Proteinabbau in allen Eukaryoten sowie in einigen Prokaryoten.^[134-136]

Das 26S-Proteasom (2500 kDa) ist ein ATP-abhängiger Komplex der sich aus dem zentralen 20S-Proteasom (700 kDa) und zwei peripheren regulatorischen 19S-Komplexen zusammensetzt.^[137]

Die Hauptaufgabe ist die Generierung eines Pools an Oligopeptiden unterschiedlicher Länge, welche dann verschiedenen zytosolischen Peptidasen zur Verwertung zugeführt werden. Ein Meilenstein in der Proteasomforschung ist die Aufklärung der atomaren Struktur. Nach der Identifizierung der Kristallstruktur des Archaeobakteriums *Thermoplasma acidophilum* Proteasoms^[138] folgte die Identifizierung des Hefe-20S-Proteasoms^[139] und das in Rindern konstitutive 20S-Kernpartikel (KP).^[140] In allen drei Lebensbereichen ist das 20S-Proteasom in seiner Strukturarchitektur, Quartärstruktur und in der Geometrie der aktiven Zentren homolog.^[129]

Das eukaryotische 20S-Proteasom ist ein 700 kDa schwerer Komplex und zylindrisch aus 28 Untereinheiten aufgebaut, die in vier axial gestapelten heptameren Ringen, zwei inneren β - und zwei äußeren α -Ringen, angeordnet sind. Die β - und die α -Ringe bestehen jeweils aus sieben Untereinheiten α_{1-7} bzw. β_{1-7} , die die gleiche Faltung aufgrund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit aufweisen. Diese Ringe sind so übereinander gelagert, dass eine Abfolge $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ mit drei großen Kavitäten zwischen den Ringen und einem durchgängigen zentralen Kanal resultiert. In den inneren β -Ringen befinden sich, wie in der Röntgenkristallstruktur des Hefe-20S-Proteasoms gezeigt werden konnte, je drei aktive Zentren (β_1 , β_2 , β_5) mit *N*-terminalen Threoninen, die den gleichen katalytischen Mechanismus aufweisen, sich aber in ihrer bevorzugten Substratspaltung und Aktivität unterscheiden. Das 20S-Partikel besitzt eine Rotationssymmetrie. Zwischen den beiden β -Ringen liegt eine C_2 -Achse (Abb. 22).^[131, 141-142]

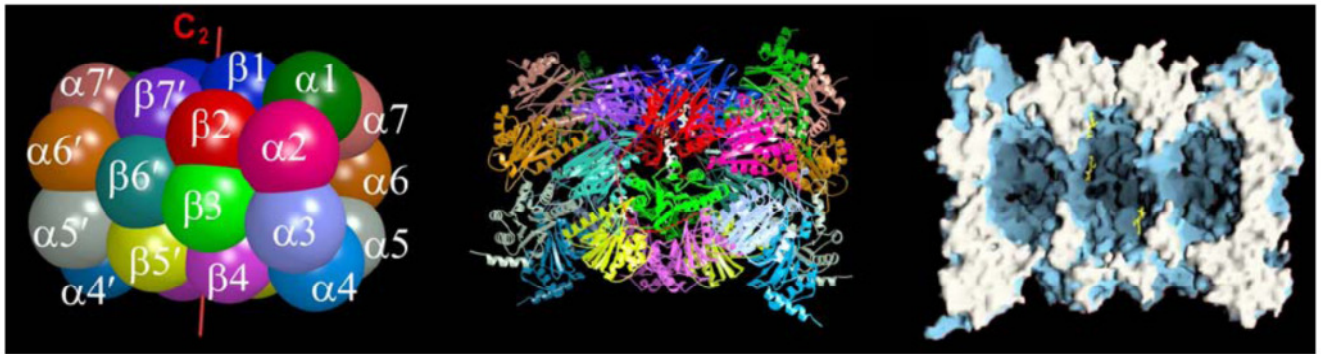


Abb. 22: Das 20S-Proteasom aus *S. cerevisiae*: Kugelmodell mit C_2 -Achse zwischen den β -Ringen (links), *ribbonplot* (mitte), Schnitt durch ein Oberflächenmodell mit Bindung des Calpain I Inhibitors an die aktiven Zentren.^[131]

Die aktiven Zentren wurden nach Enzymen ähnlicher proteolytischer Aktivität bzw. Spezifität benannt.^[143-145] Somit wird die Nukleophilie der Caspase-ähnlichen Aktivität (*peptidyl-glutamyl-peptide-hydrolyzing activity*, CA-L) mit der $\beta 1$ -Untereinheit, die eine Präferenz für saure Reste zeigt, verbunden. Die Trypsin-ähnliche Aktivität (*trypsin-like activity*, T-L) wird mit der $\beta 2$ -Untereinheit, die eine bevorzugte Spaltung nach basischen Resten zeigt, assoziiert. Die Chymotrypsin-artige Aktivität (*chymotrypsin-like activity*, CT-L) wird in der $\beta 5$ -Untereinheit gefunden, in der Substrate mit großen hydrophoben Resten abgebaut werden.^[141, 146] Somit verfügen 20S-Partikel über die Möglichkeit nach fast jedem Aminosäurerest des Proteins zu schneiden. Obwohl diese Substratpräferenzen überwiegend von den S_1 Bindungstaschen, welche hauptsächlich von Rest 45 der entsprechenden β -Untereinheiten gebildet werden, bestimmt sind, trägt die allgemeine strukturelle Architektur der proteolytischen Tasche auch zu den unterschiedlichen Substratspezifitäten bei.^[129]

In dem Immunsystem von humanen Zellen wird zusätzlich das aus drei leicht modifizierten katalytischen Untereinheiten ($\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$) bestehende Immunoproteasom exprimiert.^[147-148] Das Immunoproteasom besitzt deshalb eine leicht veränderte Substratspezifität im Vergleich zum 20S-Proteasom und scheint in der Bildung von Peptiden, die als Liganden für MHC-Klasse-I-Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) wirken, involviert zu sein. Es produziert mehrere Peptide mit hydrophoben basischen C-Termini und weniger Peptide mit sauren C-Termini um der Spezifität der MHC-Klasse-I-Moleküle zu entsprechen.^[149] MHC ist an der Initiierung oder an der Verhinderung der Immunantwort beteiligt.^[129]

Die 19S-Regulorkappen an den beiden Enden des 26S-Komplexes sind verantwortlich für die Erkennung und Bindung der ubiquitylierten Substrate sowie für die Depolymerisation der Ubiquitin-Kette. Da der 19S-Komplex direkt an die jeweiligen α -Ringe knüpft, entfaltet er die Proteine, bewerkstelligt deren Überführung in das 20S-Proteasom, indem er den ATP-abhängigen Kanal im α -Ring öffnet.^[131]

1.2.2 Die Proteolyse im 20S-Proteasom

Obwohl die Präsenz der katalytischen Einheiten des 20S-Proteasoms bekannt war, konnten erst durch die Röntgenkristallstruktur des 20S-Proteasoms mit gebundenem Inhibitor Ac-Leu-Leu-Norleucinal (Calpain-Inhibitor I, **45**, Abb. 25) die aktiven Zentren innerhalb der zentralen Kammer in jeder β -Untereinheit identifiziert werden. Sowohl die Threonin - Hydroxygruppe (Thr1O^γ) als auch die Threonin - Aminogruppe (Thr1N) fungieren als Nukleophile bei der in Abb. 23 gezeigten Hydrolyse. Die Aminosäuren Asp17, Lys33, Ser129, Asp166 und Ser169, die in dem aktiven Zentrum der β -Untereinheiten konserviert sind, sowie ein katalytisches Wassermolekül, das für die Übertragung des Protons von Thr1O^γ zum *N*-Terminus (**I**) des zu spaltenden Proteins verantwortlich ist, tragen zur proteolytischen Aktivität des Enzyms bei. Weiterhin dient das Wassermolekül der Abspaltung des Acylrestes nach erfolgter Spaltung des Peptids (**II**) und somit zur Rückbildung des aktiven Thr1O^γ -Restes (**III**).^[131, 133]

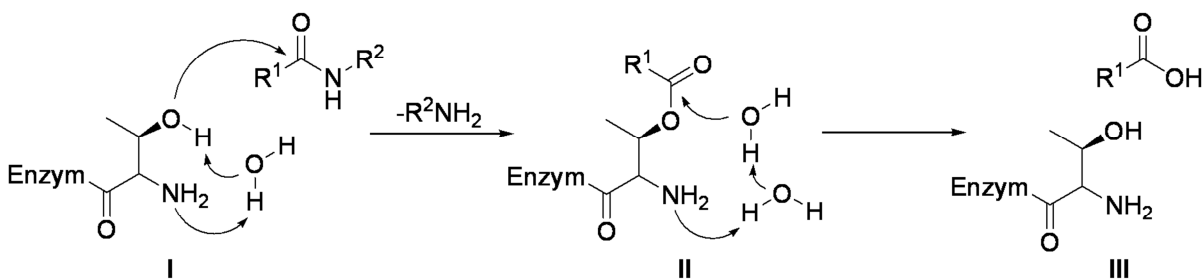


Abb. 23: Vorgeschlagener Proteolysemechanismus im 20S-Proteasom.^[133]

1.2.3 Proteasom-Inhibitoren

Aufgrund der vielfältigen Funktionen des Ubiquitin-Proteasom-Systems (Abbau zahlreicher Proteine, Regulation zellulärer Mechanismen) sowie des Einflusses des Proteasoms auf biologische Prozesse (Apoptose, Zellteilung, Zelldifferenzierung, Entzündungsbildung) stellt das Proteasom ein interessantes Target in der medizinischen Forschung zur Behandlung verschiedener Krankheiten, wie z.B. entzündlichen Erkrankungen, Krebs oder neurodegenerativen Erkrankungen dar^[133]. Reversible, selektive und spezifische 20S-Proteasom-Inhibitoren könnten daher in Zukunft als Medikamente in verschiedenen Bereichen Verwendung finden.

Während bereits eine kurzzeitige Inhibition des Proteasoms zur Akkumulation von geschädigten und fehlgefalteten Proteinen führt, unterliegen Zellen bei einer längeren Proteasom-Inhibition der Apoptose. Dies schädigt vor allem sich stark vermehrende Zellen. Die Induktion der Apoptose durch

Proteasom-Inhibitoren wird auf die Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 oder die Unterdrückung einer Aktivierung von NF- κ B zurückgeführt. NF- κ B ist ein potenter Inhibitor der Apoptose, wobei dessen Suppressor I κ B α ein Substrat des Proteasoms darstellt.^[150]

In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl an Proteasom-Inhibitoren entwickelt und zum Teil deren Bindungsmechanismus am Target aufgeklärt. Bortezomib (**39**) (Velcade®) (Abb. 24), ein Dipeptid mit Boronsäuregruppe, wurde als erster Proteasom-Blocker von der *US Food and Drug Administration* (FDA) im Mai 2003 zur Behandlung des Multiplen Myeloms und des Mantelzell-Lymphoms zugelassen.^[151-152] Außerdem ist Velcade® derzeit Gegenstand der Untersuchung für eine breite Palette von hämatologischen malignen Erkrankungen und solider Tumoren, einschließlich Non-Hodgkin Lymphoms, Prostata-, Brust- und nicht kleinzelligem Lungenkrebs und befindet sich in Phase I-III Studien. Die toxische Boronsäure **39** verursacht jedoch beträchtliche Nebenwirkungen, zum einen aufgrund der hohen Reaktivität, zum anderen wegen der geringen Selektivität.^[153-154] Daher ist es für Forschungseinrichtungen von besonderem Interesse, Proteasom-Inhibitoren mit geringen Nebenwirkungen zu entwickeln. Fünf weitere Proteasom-Inhibitoren befinden sich derzeit in klinischen Studien: zwei Peptid Boronate, CEP-18770 (**40**) und MLN-9708 (**41**), zwei Peptid Epoxyketone, Carfilzomib (**42**) und ONX-0912 (**43**) und ein β -Lacton Naturstoff Marizomib (**44**) (Abb. 24).^[155]

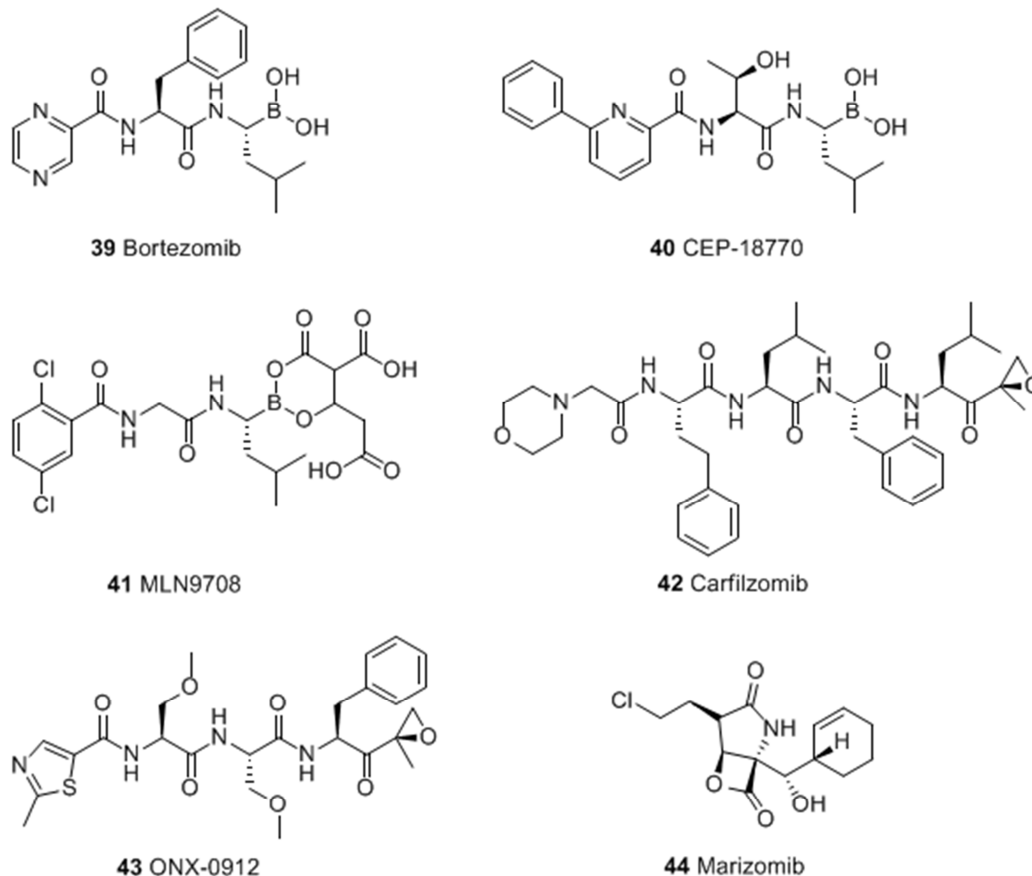


Abb. 24: Beispiele für zugelassene oder in klinischen Studien befindliche Proteasom-Inhibitoren.

Trotz der drei aktiven Zentren des 20S-Proteasoms ist es möglich dessen Aktivität durch Inhibition einzelner Zentren zu reduzieren.^[132] Somit führt die Inhibition oder Mutation der β 5-Untereinheit (CT-L) zu einer Reduktion der Geschwindigkeit des Proteinabbaus, auch derjenigen der β 1-(CA-L) und β 2-Untereinheiten (T-L). Eine Inhibition der β 1- und β 2-Untereinheiten weist keine Inhibition in der β 5-Untereinheit auf. Dadurch, dass die meisten Inhibitoren der β 5-Untereinheit stärker hydrophob und damit zellpermeabel sind, zielt die Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren oftmals auf eine Inhibition des CT-L aktiven Zentrums ab.^[132]

Der erste Proteasom-Inhibitor, der ursprünglich als Serin- und Cystein-Proteasen Inhibitor entwickelt wurde, ist Calpain-Inhibitor I (**45**) (IC_{50} (CT-L) = 15 μ M, IC_{50} (CA-L) = 45 μ M) (Abb. 25).^[131] Er inhibiert das Proteasom unselektiv und diente demzufolge lediglich der Erforschung von dessen Proteolyseeigenschaften. Gebunden an das Proteasom nimmt er eine ausgedehnte Konformation ein und besetzt einen Spalt zwischen β -Faltblättern (S_1 - S_3 Taschen) in der jeweiligen Untereinheit. Die Seitenkette von Norleucin wechselwirkt mit der inhibierten Untereinheit, das terminale Leucin mit der benachbarten Untereinheit und das mittlere Leucin ragt aus der aktiven Tasche heraus.

Aufgrund der strukturellen Unterschiede können Proteasom-Inhibitoren je nach Art der Bindung an das aktive Zentrum Threonin in kovalent und nicht-kovalent bindende Inhibitoren eingeteilt werden. Nicht-kovalente Inhibitoren binden meistens reversibel an das Threonin, während kovalente Inhibitoren bis auf wenige Ausnahmen irreversibel an das Threonin binden.^[155] Zusätzlich wurden auch allosterische Inhibitoren beschrieben, die nicht mit den aktiven Bindungsstellen wechselwirken.^[156] In den letzten Jahren wurde eine Reihe von synthetischen sowie aus Naturstoffen isolierten Inhibitoren gefunden. Obwohl das CT-L aktive Zentrum das Target aller natürlichen Proteasom-Inhibitoren ist, inhibieren Naturstoffe bei höheren Konzentrationen auch die T-L und CA-L aktiven Zentren.^[155]

1.2.3.1 Kovalent bindende Proteasom-Inhibitoren

Kovalent bindende Inhibitoren bestehen gewöhnlich aus einer elektrophilen Kopfgruppe, welche mit dem aktiven Zentrum Threonin interagiert und einem peptidischen Rückgrat. Basierend auf der elektrophilen Funktionalität lassen sich kovalent bindende Inhibitoren in folgende Klassen unterteilen:

Peptidaldehyde, wie z.B. MG-132 (**46**) (IC_{50} = 4.0 nM)^[152] und PSI (**47**) (IC_{50} = 0.25 μ M),^[157] waren die ersten entwickelten Proteasom-Inhibitoren (Abb. 25). Diese reversiblen potenten Inhibitoren blockieren das Proteasom durch Bildung eines Halbacetals mit der Hydroxygruppe des Threonins (Thr1) (Abb. 25) und sind in hohem Maße zellpermeabel. Der Nachteil besteht jedoch in ihrer

schnellen Oxidierbarkeit in Zellen, sodass sich die inaktiven Säuren bilden. Daraufhin wurden stabilere Ketone wie **48** ($IC_{50} = 0.02 \mu M$)^[158-159] entwickelt.

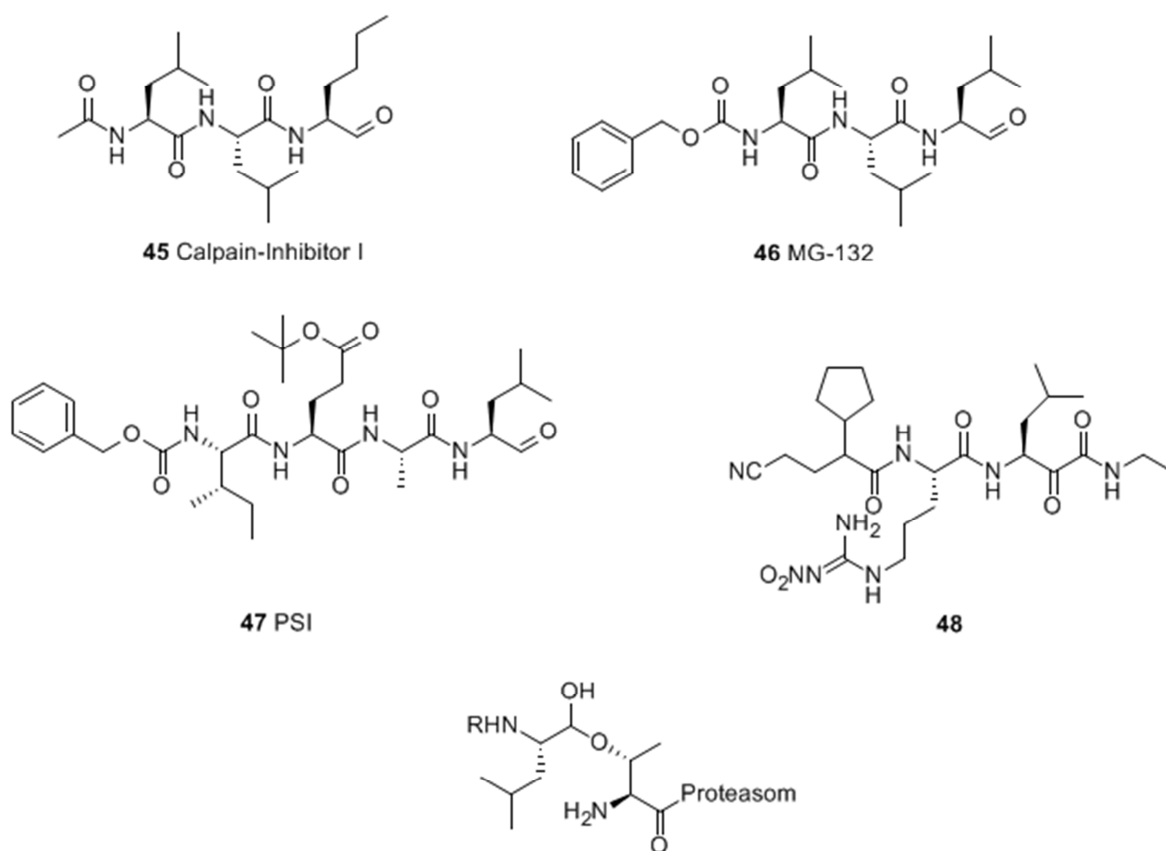


Abb. 25: Beispiele für peptidische Aldehyde (**45**, **46**, **47**) und α -Ketoamide (**48**) als Proteasom-Inhibitoren sowie die Wechselwirkung der Inhibitoren mit dem katalytischen Threonin am Proteasom.

Peptidboronsäuren, wie MG-262 (**49**) ($K_i = 18 \text{ pM}$), ein Borsäureanalogon von MG-132, und die in klinischen Studien befindlichen Boronate Bortezomib (**39**), CEP-18770 (**40**) und MLN2238 (**41**) (Abb. 24, 26), sind potentere Inhibitoren ($K_i < 1 \text{ nM}$) des Proteasoms als die entsprechenden Aldehyde, wirken spezifisch auf die $\beta 5$ -Untereinheit und sind zellpermeabel.^[152] Sie bilden tetraedrische Addukte mit dem aktiven Zentrum von Threonin, die ferner über eine Wasserstoffbrücke zwischen der *N*-terminalen Aminogruppe des Threonins und einer der Hydroxygruppen der Boronsäure stabilisiert werden. Die Bindung an das aktive Zentrum ist reversibel, die Dissoziationskonstante allerdings so niedrig, dass die Inhibition für Stunden irreversibel ist (Abb. 26).^[155]

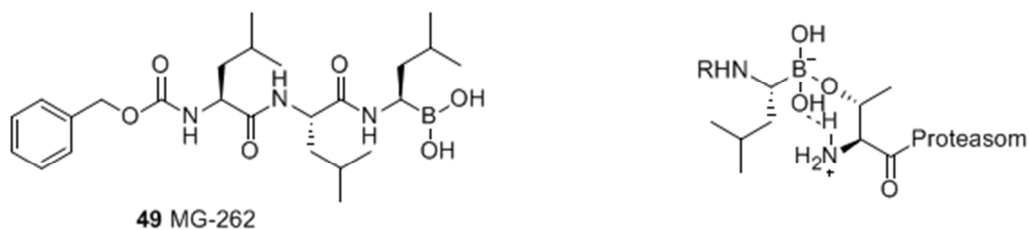


Abb. 26: Beispiel für peptidische Boronsäuren (**49**) als Proteasom-Inhibitoren sowie die Wechselwirkung der Inhibitoren mit dem katalytischen Threonin am Proteasom.

Peptidische Epoxyketone sind bis heute die spezifischsten und potentesten Proteasom-Inhibitoren. Epoxomicin (**50**) ist ein natürliches α -Ketoepoxid und wurde in den 90er Jahren aus einem Stamm von *Actinobakteria* isoliert (Abb. 27). Es bindet irreversibel an das Proteasom und weist keine weiteren inhibitorischen Effekte auf andere Proteasen auf.^[160] Die Inhibition von CT-L ist 100 – 1000 fach stärker als die von CA-L und T-L.^[161] Die Kokristallisation des Hefe-20S-Proteasoms mit Epoxomicin zeigt, dass das *N*-terminale Threonin und der Epoxyketonrest des Inhibitors einen sechsgliedrigen Morphinring ausbilden.^[131] Der Sechsring entsteht durch den Angriff der Hydroxygruppe des Threonins auf die Carbonylfunktion und anschließende Ringöffnung durch den nukleophilen Angriff der α -Aminogruppe des Threonins auf das Epoxid (Abb. 27). Aufgrund der hohen Wirksamkeit und der außergewöhnlichen Spezifität dieses Naturproduktes wurden weit mehr als hundert Derivate synthetisiert. Zwei Epoxyketone, Carfilzomib (**42**)^[153] und ONX-0912 (**43**), befinden sich in klinischen Studien (Abb. 24).

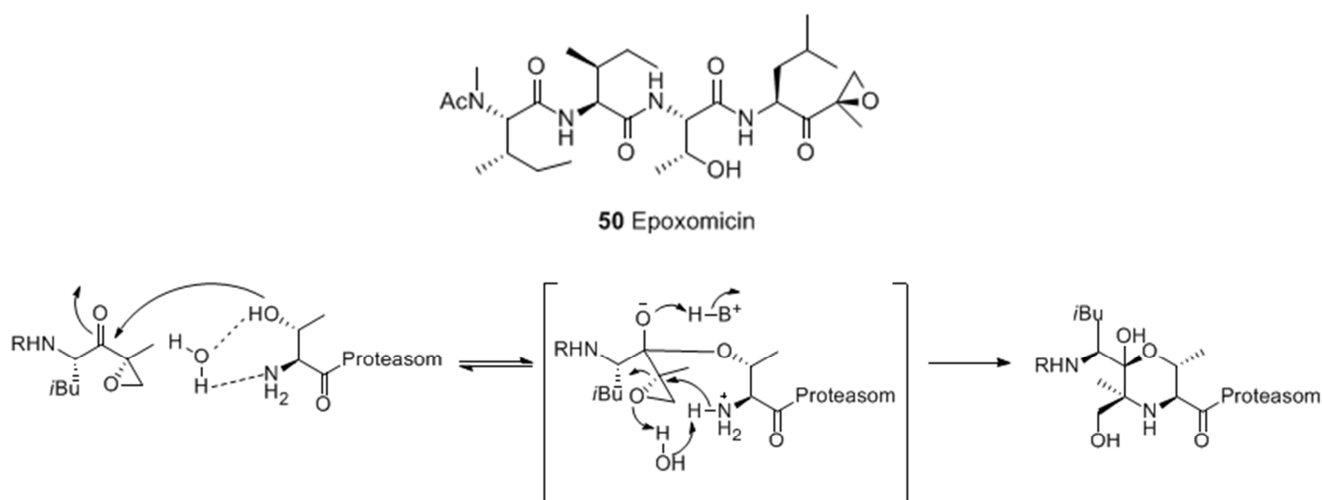


Abb. 27: Beispiel für peptidische Epoxyketone (**50**) als Proteasom-Inhibitoren sowie die Wechselwirkung der Inhibitoren mit dem katalytischen Threonin am Proteasom.

Peptidische α -Ketoaldehyde wurden 1990 von Lynas et. al.^[162] entwickelt, jedoch lange Zeit verkannt, da der Vorteil gegenüber anderen Strukturklassen unklar war. Erst durch die Röntgenstrukturanalyse von Z-LeuLeuTyr-COCHO (**51**) (Abb. 28) gebunden am Hefe-20S-Proteasom konnte die Bildung eines sechsgliedrigen Ringes mit dem *N*-terminalen Threonin bewiesen werden (Abb. 28).^[163] Der Sechsring entsteht durch den Angriff der Hydroxygruppe des Threonins auf den Carbonylkohlenstoff der α -Ketogruppe mit anschließender nukleophiler Addition der α -Aminogruppe des Threonins an den Aldehyd-Carbonylkohlenstoff unter Bildung eines Carbinolamin-Übergangszustandes gefolgt von der Freisetzung eines Wassermoleküls (Abb. 28). Obwohl peptidische α -Ketoaldehyde und Epoxomicin-Derivate einen sechsgliedrigen Ring ausbilden, besteht der Unterschied darin, dass der Bindungsmechanismus der α -Ketoaldehyde in zwei reversiblen Schritten abläuft. Des Weiteren binden α -Ketoaldehyde selektiv an die $\beta 5$ -Untereinheit.

Diese Selektivität in Kombination mit der Reversibilität macht diese Klasse von Inhibitoren zu hochspezifischen, reversiblen, kovalenten Inhibitoren. Die anderen vielversprechenden Strukturklassen sind entweder irreversibel (Epoxyketone, β -Lactone) oder reversibel, jedoch nicht spezifisch bindend (Aldehyde).

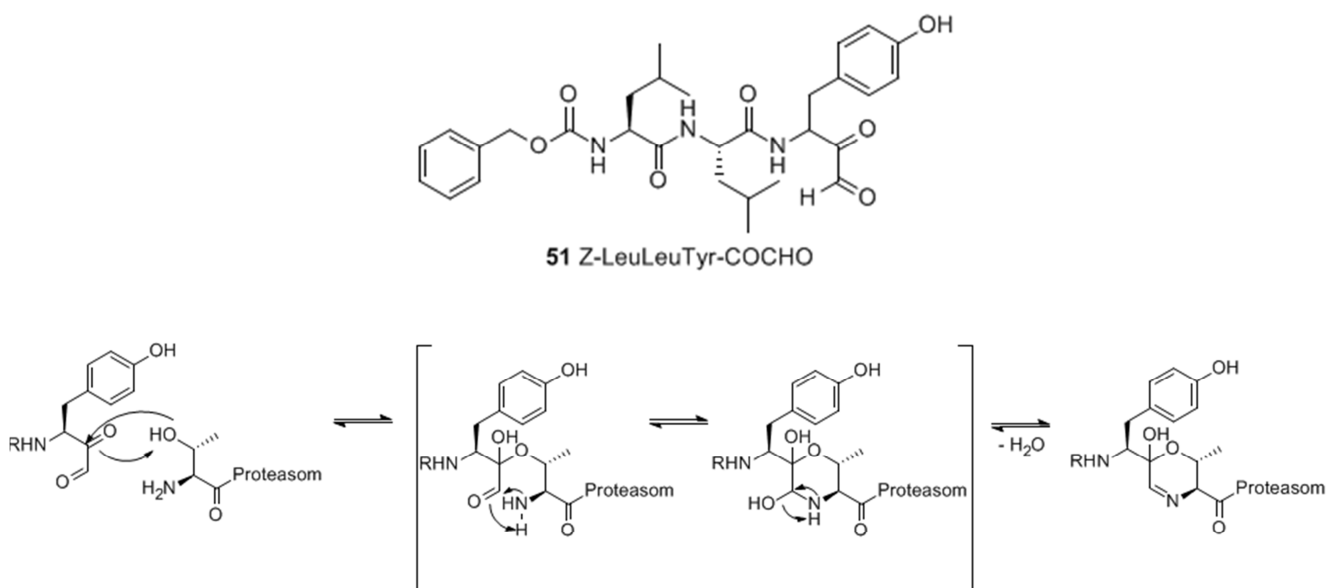


Abb. 28: Beispiel für peptidische Ketoaldehyde (**51**) als Proteasom-Inhibitor sowie die Wechselwirkung der Inhibitoren mit dem katalytischen Threonin am Proteasom.

β -Lactone wie z.B. Verbindung **52**^[132] sind nicht-peptidische Naturstoffe (Abb. 29). Einerseits bindet diese Klasse von Inhibitoren spezifischer als Aldehyde, jedoch unspezifischer als Epoxyketone. Dennoch wurden in den letzten Jahren einige β -Lacton-Inhibitoren entwickelt.^[164] Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist Marizomib (**44**) (Abb. 24). Sowohl **52** als auch **44** inaktivieren das Proteasom durch Veresterung der Hydroxygruppe des katalytischen Threonins. Speziell bei Marizomib

(**44**) erfolgt nach Öffnung des β -Lactonrings die Bildung eines Tetrahydrofuranrings durch die nukleophile Verdrängung des Chloratoms (Abb. 29).^[165] Alle β -Lacton Addukte werden langsam durch Wasser hydrolysiert, woraus eine Reaktivierung des Proteasoms resultiert,^[166] während bei Marizomib (**44**) der Tetrahydrofuran-Ring das Addukt stabilisiert und zu einer länger anhaltenden Inhibition führt (Abb. 29).^[155]

Eine weitere Gruppe von β -Lactonen sind die Belactosine, wie z.B. Belactosin A (**53**) (Abb. 29). Diese Gruppe bindet im Gegensatz zu allen anderen Inhibitoren an der *prime site* des Enzyms.^[155]

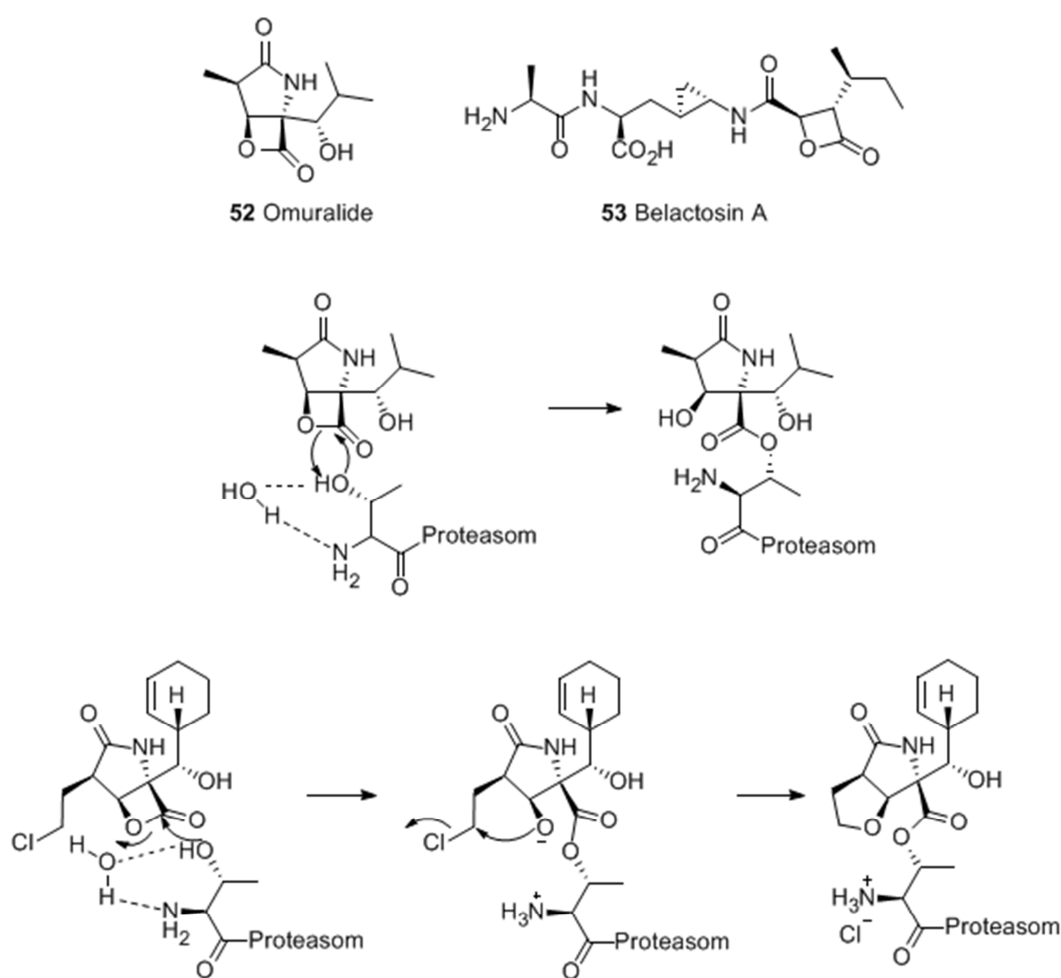


Abb. 29: Beispiele für β -Lactone **52** und **53** als Proteasom-Inhibitoren sowie die Wechselwirkung von allgemeinen β -Lactonen und Marizomib (**44**) mit dem katalytischen Threonin am Proteasom.

Peptidische Vinylsulfone wie **54** und **55** sind Proteasom-Inhibitoren, die irreversibel mit dem aktiven Zentrum Threonin reagieren. Die Struktur des resultierenden kovalenten Addukts zeigt, dass die Hydroxygruppe des Threonins mit der Michael-Akzeptor-Position der Vinylsulfon-Einheit reagiert (Abb. 30).^[131]

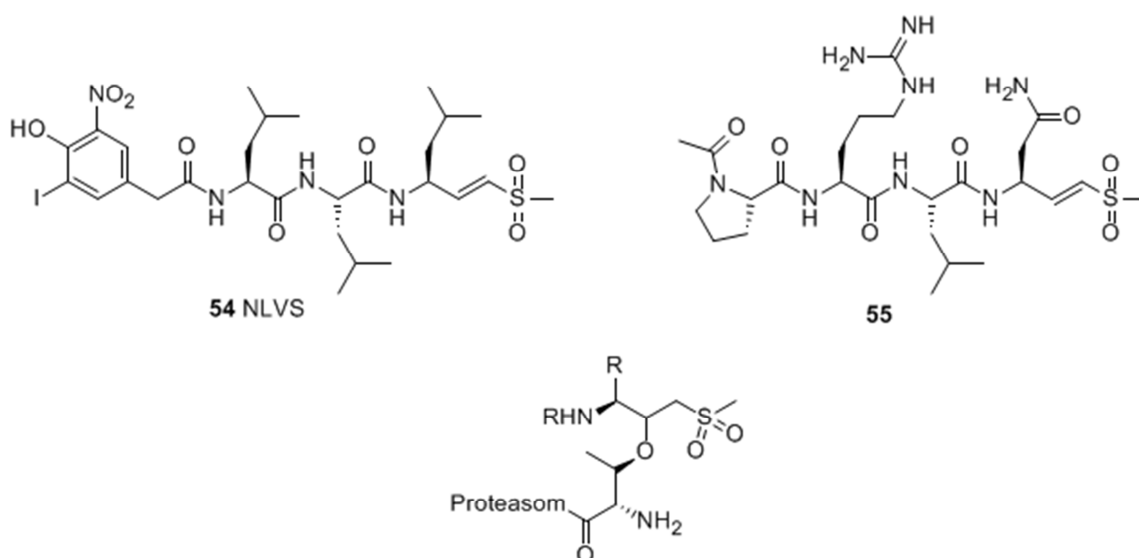


Abb. 30: Beispiele für peptidische Vinylsulfone **53** und **54** als Proteasom-Inhibitoren sowie die Wechselwirkung der Inhibitoren mit dem katalytischen Threonin am Proteasom.

Peptidische Vinylsulfone sind synthetisch besser zugänglich als Epoxyketone, allerdings weniger potent und spezifisch. Die Selektivität der Inhibition hängt von der Länge des Peptidgerüsts des Inhibitors ab.^[155]

1.2.3.2 Nicht-kovalent bindende Proteasom-Inhibitoren

Cyclische Peptide. TMC-95A (**56**) (Abb. 31) und seine Derivate sind konformativ cyclische Peptide, die an alle aktiven Zentren des Proteasoms ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) fest binden und dadurch den Zugriff des Substrates an das katalytische Threonin einschränken. Nach der Totalsynthese des nicht-kovalent bindenden Inhibitors TMC-95A (**56**) wurden noch weitere Derivate mit einer höheren Spezifität gegenüber der aktiven Zentren synthetisiert.^[155]

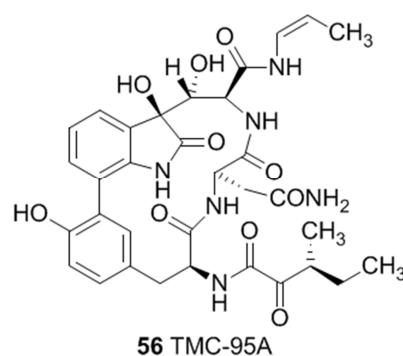


Abb. 31: Beispiel für ein cyclisches Peptid **56** als Proteasom-Inhibitor.

Nichtcyclische Peptide und Peptidisostere, wie z.B. das peptidische Benzylstatin **57**, wurden von Novartis als eine der ersten Proteasom-Inhibitoren mit einem Übergangszustandsisoster entwickelt. Die Optimierung dieser Verbindung führte zu einer großen Anzahl von selektiven CT-L-Inhibitoren und letztendlich zu potenten *N*- und *C*-terminalen gekappten Dipeptiden, wie z.B. das gekappte Dipeptid 2 (**58**) (Abb. 32). Die Röntgenstrukturanalyse zeigt, dass Verbindung **58** nicht mit dem aktiven Zentrum des Threonins wechselwirkt, sondern mit den S-Bindungs-Taschen.^[167]

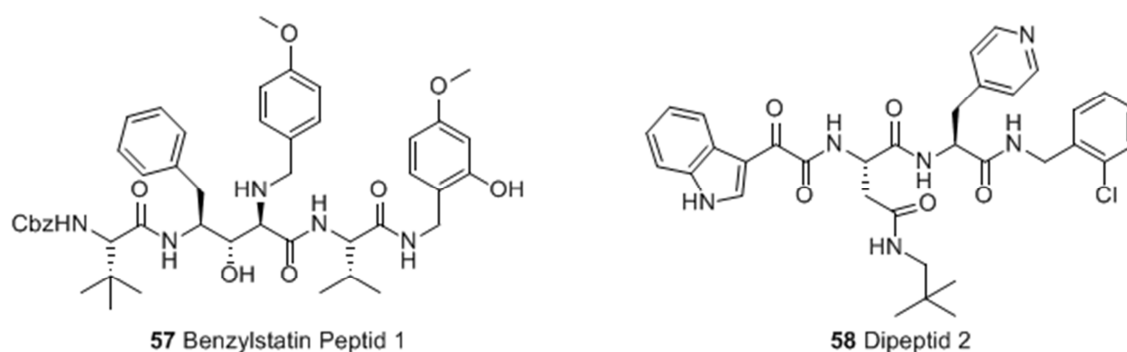


Abb. 32: Beispiele für Peptidisostere (**57**) und nichtcyclische Peptide (**58**) als Proteasom-Inhibitoren.

Nichtpeptidische Inhibitoren. Verbindung PI-083 (**59**) wurde in einem *screening* von chemischen Bibliotheken gegen gereinigtes Proteasom als ein nichtpeptidischer Inhibitor der nicht-kovalent mit dem aktiven Zentrum interagiert, identifiziert.^[168] Die Besonderheit dieses Inhibitors ist, dass er das Proteasom selektiv in veränderten Zellen inhibiert, während in nicht veränderten Zellen keine Inhibition zu sehen ist.

Hydroxyharnstoffe sind eine weitere Klasse von Proteasom-Inhibitoren. Durch chemische Variation wurde der CT-L-Inhibitor (**60**) erhalten ($K_i \sim 30$ nM) (Abb. 33). Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, dass die S_1 - und S_3 -Taschen von den hydrophoben Gruppen besetzt werden und kein direkter Kontakt mit dem aktiven Zentrum des Threonins vorhanden ist.^[169]

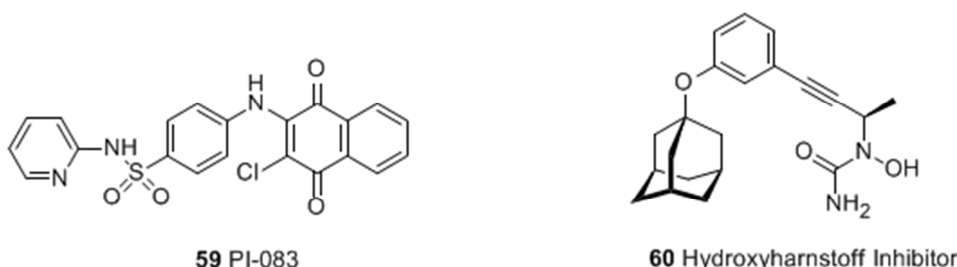


Abb. 33: Beispiele für nichtpeptidische Proteasom-Inhibitoren (**59**) und (**60**).

2 Zielsetzung der Arbeit

Sowohl die Alzheimer-Demenz als auch Krebserkrankungen sind verheerende Krankheiten, die deshalb nicht nur im Fokus der Forschung stehen sondern auch ein breites öffentliches Interesse hervorrufen. Trotz der immensen Bemühungen geeignete Wirkstoffe für die Alzheimer-Demenz zu finden, ist es bis zu dem heutigen Zeitpunkt noch nicht gelungen, ein wirksames Medikament zu finden. In der Krebstherapie, sind größere Fortschritte erzielt worden, jedoch existiert immer noch eine große Anzahl von Krebsformen, die schlecht oder gar nicht therapierbar sind. Demnach bleibt das Ziel von Wissenschaftlern und pharmazeutischen Unternehmen die Suche nach geeigneten Wirkstoffen, die als Medikamente für die entsprechenden Erkrankungen Anwendung finden.

Basierend auf den in der Einleitung beschriebene Zusammenhänge über die Ursachen und Möglichkeiten zur Bekämpfung dieser Krankheiten wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Teilprojekte bearbeitet:

- Synthese von peptidischen Aldehyden und reduzierten Amid-Isosteren als BACE1-Inhibitoren.
- Synthese von NSAID-abgeleiteten γ -Sekretase Modulatoren durch Derivatisierung der Seitenkette und Austausch der Carbonsäurefunktion durch Säureisostere.
- Synthese von Bepidil-Derivaten als γ -Sekretase Modulatoren.
- Synthese von photoreaktiven biotinylierten Carbazolderivaten zur Identifizierung der γ -Sekretase Bindungsstelle.
- Entwicklung einer neuen und effizienten Syntheseroute für α -Ketoaldehyde sowie peptidischen α -Ketoaldehyden.
- Synthese von peptidischen 20S-Proteasom Inhibitoren.

3 Allgemeiner und kumulativer Teil der Arbeit

In den folgenden Kapiteln werden die Inhalte der Publikationen sowie die Versuche und deren Ergebnisse vorgestellt, die im Rahmen dieser Dissertation in verschiedenen Projekten bearbeitet wurden.

3.1 Synthese von Aspartylprotease-Inhibitoren über C₁-Homologisierung von Peptidaldehyden und Studien an reduzierten Amiden

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits veröffentlicht:

Autoren: Hannes A. Braun, Andrea Zall, Manfred Brockhaus, Marco Schütz, Reinhard Meusinger, Boris Schmidt.

Titel: *“Aspartic protease inhibitors via C₁-homologation of peptidic aldehydes and studies on reduced amide”.*

Journal: Tetrahedron Letters, **2007**, 48, 7990-7993.

Zusammenfassung:

Die Inhibition von BACE1 stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, den Beginn der Plaquebildung durch Verringerung des A β -Spiegels im Gehirn zu blockieren. (*R*)-konfigurierte Isophthalhydroxyethylamine spielen eine wichtige Rolle bei der Inhibition der β -Sekretase (BACE1). Eine Reihe von (*S*)-konfigurierten Hydroxyethylaminderivaten wurde über 2-Iodoethanol Intermediate synthetisiert und mit den entsprechenden (*R*)-Analoga verglichen. Des Weiteren wurde ein *N*-substituiertes Indol **26** als Ersatz für den Isophthalamidteil synthetisiert und untersucht, anschließend mit einem reduzierten Amidisoster kombiniert und mit dem Isophthalamid Analoga verglichen. Das Indol **26** ist in mikromolaren Konzentrationen bezüglich BACE1 aktiv und zeigt ähnliche Aktivitäten wie Isophthalamid **30**. Überraschenderweise ergibt sich eine ca. 1000-fache verminderte Aktivität im Vergleich zu Amid **3**.

Die im Rahmen dieser Arbeit projektbezogenen hergestellten Verbindungen:

8a, 9a, 22, 23, 24, 25, 26.

Die Durchführung und Auswertung der einzelnen Verbindungen befinden sich in **Kapitel 4.2**.

Aspartic protease inhibitors via C₁-homologation of peptidic aldehydes and studies on reduced amide isosteres

Hannes A. Braun,^a Andrea Zall,^a Manfred Brockhaus,^b Marco Schütz,^a
Reinhard Meusinger^a and Boris Schmidt^{a,*}

^aClemens Schöpf Institute for Organic Chemistry and Biochemistry, Darmstadt University of Technology,
Petersenstr. 22, 64287 Darmstadt, Germany

^bDepartment of PRBD-N Neuroscience, F. Hoffmann-La Roche, 4070 Basel, Switzerland

Received 29 June 2007; revised 29 August 2007; accepted 7 September 2007

Available online 12 September 2007

Abstract—(*R*)-Configured isophthalic hydroxyethylamines play an important role in the inhibition of β -secretase (BACE1). We present the synthesis of a number of (*S*)-configured hydroxyethylamine derivatives via 2-iodoethanol intermediates and the comparison with the (*R*)-analogues. An *N*-substituted indole was investigated as a substitute for the isophthalamide moiety.
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Extracellular amyloid- β plaques are suspected to cause Alzheimer's disease.^{1,2} These plaques consist mainly of amyloid- β peptides (A β) which are generated from the membrane bound APP (amyloid precursor protein) via the consecutive cleavages by β -secretase (BACE1, β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme) and γ -secretase.³ Thus, the inhibition of BACE1 constitutes a promising approach to block the onset of plaque formation by decreasing the A β levels in the brain.

A number of highly potent, but peptidic BACE1 inhibitors have been available for several years.^{4,5} Inhibitors 1–3 have derived from the progressive elimination of peptidic features from the original heptapeptidic hydroxyethylamines (Fig. 1). The introduction of an isophthalic moiety in 1 was regarded as a milestone in the development of small BACE1 inhibitors.⁶ The peptidic character of compound 1 was further reduced by the replacement of the hydroxyethylene with a hydroxyethylamine. Remarkably, the hydroxyethylamine in 2 is the only transition state isostere in BACE1 inhibitors that displays an (*R*)-configured secondary alcohol.⁷ Compound 3 comprises a reduced amide transition state isostere with an additional sulfonamide

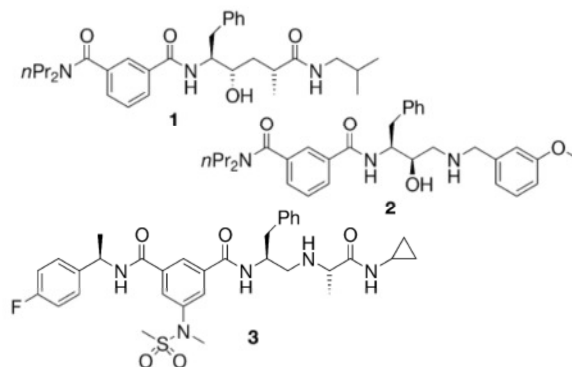


Figure 1. BACE1 inhibitors by Elan pharmaceuticals and MSD.

substituent in the P2 position and a modified P3 amide residue.⁸ Compounds 1–3 are active at nanomolar concentrations in cell free assays and yet display different cellular activities. They are good substrates for the p-glycoprotein transporter, this was partially assigned to the isophthalic amide moiety.⁹

Here, we present an approach to isophthalamide based hydroxyethylamines and potential replacements thereof. We compared a linear to a convergent access to this class of compounds. The synthesis led to the (*S*)-configured secondary alcohols which were compared to the known (*R*)-analogue 2. Furthermore, we investigated

Keywords: β -Secretase; Transition state isostere; Hydroxyethylamine; Reduced amide; Grignard reagent; Indole synthesis.

*Corresponding author. Tel.: +49 6151 163075; fax: +49 6151 163278; e-mail: schmidt_boris@t-online.de

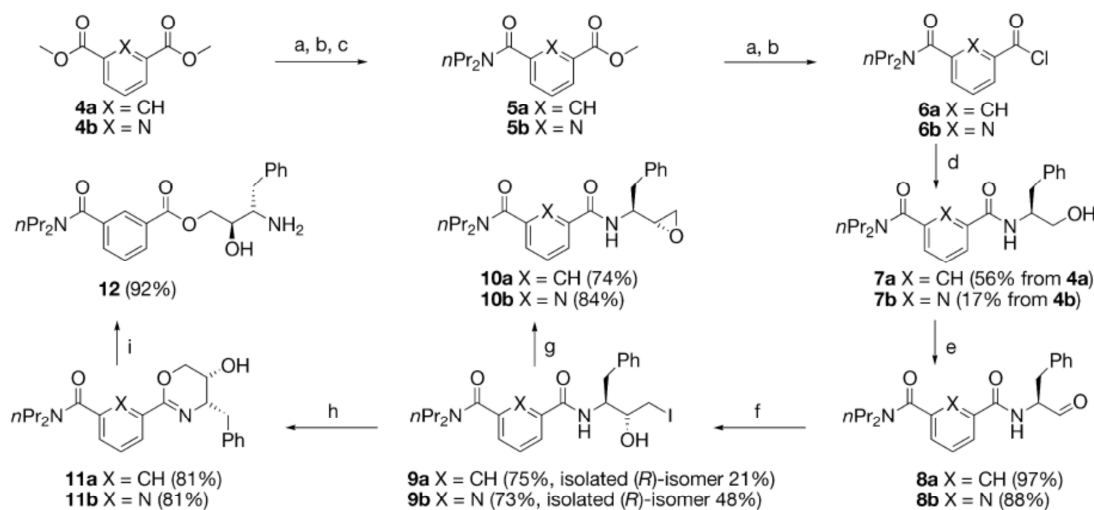


Figure 2. Synthesis of epoxides **10a** and **10b** and ester **12**. Reagents and conditions: (a) KOH, MeOH, rt; (b) SOCl₂, CHCl₃, reflux, (overnight); (c) *n*-Pr₂NH, CH₂Cl₂, 0 °C to rt; (d) L-phenylalaninol, CH₂Cl₂, 0 °C to rt; (e) IBX, DMSO, rt, 15 h; (f) *i*-PrMgCl, CH₂I₂, THF, –78 °C (15 min), 0 °C (2 h); (g) K₂CO₃, MeCN, rt (4 h); (h) 4-bromobenzylamine, MeCN, reflux (4 h); (i) water, THF, trifluoroacetic acid, 80 °C (1 h), rt (15 h).

an indole as a replacement for the isophthalamide portion, combined it with a reduced amide isostere and compared it to the isophthalamide analogue.

A reaction sequence starting from diester **4a** was employed for the generation of **5a**, **6a** and finally the isophthalamide **7a** comprising two different amide substituents on either carboxyl functionality (Fig. 2).¹⁰ Alcohol **7a** was oxidized by IBX (2-iodoxybenzoic acid) furnishing aldehyde **8a** in a high yield and free of racemisation. The aldehyde was converted to a 2-iodoethanol using a moderately stereoselective C₁-homologation.¹¹ The reaction occurs upon treatment with *i*-PrMgCl/CH₂I₂ forming a mild Grignard reagent that undergoes addition to peptidic aldehydes in a high chemoselectivity leaving the α-chiral position unchanged. Product **9a** (crude ds = 3:1) was obtained in 75% yield as a diastereomeric mixture and further purification delivered pure **9a**. Treatment of **9a** with K₂CO₃ yielded epoxide **10a**. Surprisingly, **9a** was converted to oxazine **11a** upon treatment with any benzylamine in MeCN under reflux. **11a** could be opened to ester **12** by treatment with trifluoroacetic acid in a water/THF mixture. A small amount of the diastereomer of **11a** was generated likewise, and the cyclic structures of both diastereomers of **11a** served to assign the configuration of compounds **9–12**. The reactions to the analogous compounds **5b–11b** starting from dimethyl 2,6-pyridinedicarboxylate **4b** were conducted in a similar manner. The higher yield of **9b** (de = 100%) compared to **9a** is explained by the higher diastereoselectivity of the C₁-homologation (crude ds = 9:1). Even though the generation of **9a** or **9b** seemed to be a promising approach for a variety of benzylic hydroxyethylamines, the iodo compounds reacted under a variety of conditions to the undesired oxazines. This undesired reaction was circumvented in previous synthetic approaches:¹² (a) by the protection of the amide nitrogen or (b) by the conversion of an *N*-Boc-protected amino acid deriv-

ative (e.g., **15**) or its respective epoxide, which does not undergo cyclization. This difference in carbamate versus amide reactivity was applied to the synthesis of the desired hydroxyethylamines. Boc-phenylalaninol **13** was oxidized to **14** with IBX and converted to β-iodoethanols **15a** and **15b** (de > 99%, crude ds = 3:2, Fig. 3).

Either diastereomer was obtained in high purity from the crude diastereomeric mixture (53%). Substitution of the iodide by various benzylamines provided hydroxyethylamines **16**. Deprotection and reaction with chloride **6a** led to the desired (*S*)-configured alcohols **17–20** and (*R*)-alcohol **2**. The configuration was assigned by single crystal X-ray analysis of **15a** and subsequent conversions of **15b** to known compounds and comparison of the NMR data.¹¹

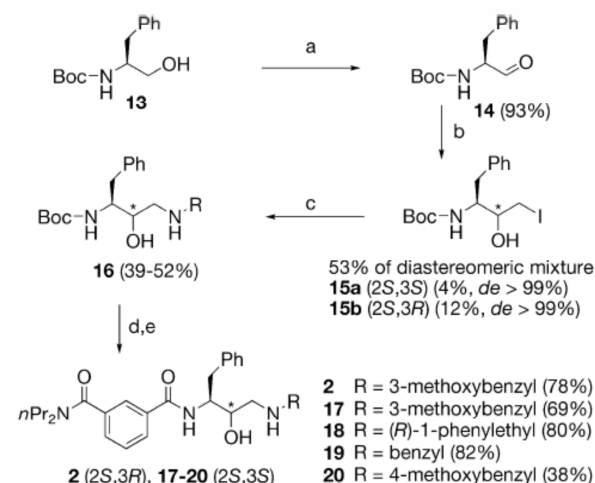


Figure 3. Reagents and conditions: (a) IBX, DMSO, rt (15 h); (b) *i*-PrMgCl, CH₂I₂, THF, –78 °C (15 min), 0 °C (2 h); (c) amine, MeCN, reflux (4 h); (d) trifluoroacetic acid, CH₂Cl₂; (e) **6a**, HOBt, CH₂Cl₂ (overnight).

Epoxides **10a**, **10b**, oxazine **11a**, ester **12** and hydroxyethylamines **2**, **17–20** were tested in BACE1-assays (fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay,¹³ RLBA (radioactive ligand binding assay)¹⁴ in the presence of detergent (Tween 20) or serum albumin (BSA)) and a FRET Cathepsin D assay¹³ (Table 1). The epoxides proved to be inhibitors equally of both BACE1 and Cathepsin D. In further studies using the RLBA assay compound **10a** showed an irreversible, time-dependent inhibition. The apparent IC₅₀ was 39 μM after 10 min and 3 μM after 60 min incubation. The same compound was not active in a cellular system measuring Aβ production by HEK293 cells. Compound **11a** was investigated because of the structural similarity to an oxazole reported by Rajapakse et al.¹⁵ While the oxazole was inactive, its hydrolyzed linear form was a highly potent inhibitor. Similar to the oxazole, oxazine **11a** displayed no inhibition of BACE1 and its ring-opened derivative **12** was a moderate inhibitor of BACE1. Interestingly, the (*S*)-configured hydroxyethylamines displayed no inhibition of BACE1. This proves the importance of the opposite (*R*)-configuration on the secondary alcohol in hydroxyethylamines compared to other transition state isosteres.

In search of an isophthalamide replacement we and others^{12,16} hypothesized that the indole nitrogen in a (4-amino-6-carboxyl)-indole (e.g., **23**) could be attached to an alkyl substituent mimicking the P3 residue, while the amine functionality can be converted into a sulfonamide and the carboxylate serves as a linker to a transition state isostere. Such indoles display H-bonds and thus may exhibit a reduced affinity for the p-glycoprotein transporter⁹ and the enhanced rigidity might increase their activity. The synthesis started from the C₂-symmetrical acid **21** (Fig. 4). After esterification, an enamine was generated that underwent cyclization to the indole in a subsequent Pd/C catalyzed reduction.¹⁷ The resulting amine was converted into a methyl sulfonamide and the amide nitrogen was methylated after selective deprotonation. After a second deprotonation, the indole nitrogen was alkylated with *i*-BuI and the ester was saponified to furnish building block **25**.

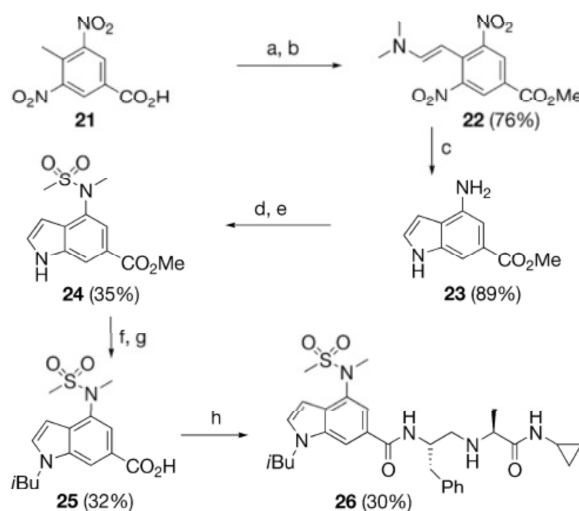


Figure 4. Reagents and conditions: (a) (i) SOCl₂, CHCl₃, reflux (overnight) (ii) MeOH, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C to rt; (b) HC(NMe₂)(OMe)₂, CuI, DMF, microwave (180 °C, 10 min); (c) Pd/C, H₂, MeOH, 3 d; (d) MeSO₂Cl, THF, rt (4 h); (e) NaH, MeI, THF, rt (1 h); (f) K₂CO₃, *i*-BuI, DMF, 80 °C (2 d); (g) KOH, MeOH, reflux (2 d); (h) (i) EDAC, HOBT, CH₂Cl₂, (ii) **29b**, Et₃N.

A reduced amide transition state isostere was chosen for elongation. Coburn et al.⁸ reported on a variety of reduced amides similar to **3** and two of the most active isosteres were generated via reductive amination based on a Z-strategy. Z-L-alanine **27** was coupled with *i*-BuNH₂ or cyclopropylamine (c-PrNH₂) to the respective amides (**Fig. 5**). The resulting amides were deprotected and converted to **28a** and **28b** by treatment with *N*-Z-L-phenylalaninal and Na(AcO)₃BH. The primary amines were deprotected to provide the transition state isosteres **29a** and **29b**. Compound **29b** was coupled to indole **25** in a final step leading to inhibitor **26**. The secondary amine **29a** was coupled with **6a** to provide compound **30** in order to compare the activity of indole **26** with other P2–P3 mimetics. Indole **26** is active at micromolar concentrations and exhibits a similar activ-

Table 1. IC₅₀ of compounds **2**, **10a**, **10b**, **11a**, **12**, **17–20**, **26** and **30**

Compounds	BACE1			CatD
	FRET IC ₅₀ (μM)	RLBA (tween) IC ₅₀ (μM)	RLBA (BSA) IC ₅₀ (μM)	FRET IC ₅₀ (μM)
2	1.2	0.14	0.19	0.1
10a	106	10.4	11.0	63.0
10b	95.7	15.4	16.2	194.2
11a	—	—	—	197.6
12	91.1	37.9	36.4	39.0
17	76.5	34.2	37.9	19.3
18	>200	—	—	63.3
19	200	200	127	12.3
20	—	—	—	69.2
26	35	25	20	75
30	17.0	4.6	8.6	84.9

No inhibition: —.

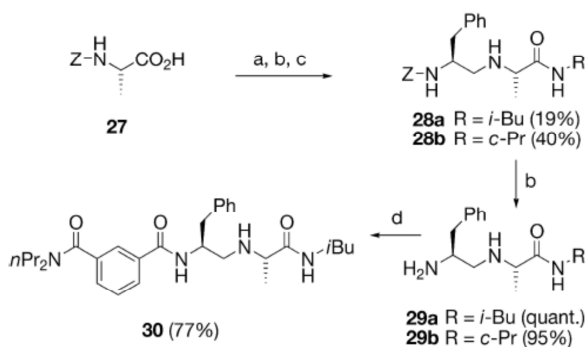


Figure 5. Reagents and conditions: (a) (i) EDAC, HOBT, CH₂Cl₂, (ii) amine, Et₃N; (b) Pd/C, H₂, MeOH, 3 d; (c) *N*-Z-L-phenylalaninal, Na(AcO)₃BH, Et₃N, MgSO₄, CH₂Cl₂, rt (overnight); (d) **6a**, HOBT, CH₂Cl₂, rt (15 h).

ity like isophthalamide **30** (Table 1). Surprisingly, this results in an approximately 1000-fold decreased activity compared to amide **3** (IC_{50} = 24 nM).

In conclusion, we confirmed the (*S*)-configured hydroxyethylamines to be inactive and thus to constitute an exception to all other transition state isosteres employed in BACE1 inhibition. However, (*S*)-configured hydroxyethylamines are known as isosteres in inhibitors targeting other aspartyl proteases. The depicted C_1 -homologation resulted in useful intermediates for such protease inhibitors. The direct nucleophilic opening of acyl *N*-protected α -aminoepoxides is an attractive synthesis to bioactive molecules, but turned out to be inaccessible. However, the initially undesired cyclization allowed us to unambiguously establish the stereochemistry due to cyclic constraints. The combination of an indole bearing an *i*-butyl P3 residue and a methyl sulfonamide P2 residue proved equally potent as the *N,N*-dipropylisophthalamide analogue, but neither of the compounds displayed activities comparable to the most potent BACE1 inhibitors.

Acknowledgements

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SPP1085 SCHM1012-3) and the EU Contract LSHM-CT-2003-503330 (APOPIs).

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.tetlet.2007.09.047](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.09.047).

References and notes

1. Selkoe, D. J. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741–766.
2. Adalbert, R.; Gilley, J.; Coleman, M. P. *Trends Mol. Med.* **2007**, *13*, 135–142.
3. Weidemann, A.; Eggert, S.; Reinhard Friedrich, B. M.; Vogel, M.; Paliga, K.; Baier, G.; Masters Colin, L.; Beyreuther, K.; Evin, G. *Biochemistry* **2002**, *41*, 2825–2835.
4. Guo, T.; Hobbs, D. W. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1811–1829.
5. Schmidt, B.; Baumann, S.; Narlawar, R.; Braun, H. A.; Larbig, G. *Neurodegenerative Dis.* **2006**, *3*, 290–297.
6. Hom Roy, K.; Gailunas Andrea, F.; Mamo, S.; Fang Larry, Y.; Tung Jay, S.; Walker Donald, E.; Davis, D.; Thorsett Eugene, D.; Jewett Nancy, E.; Moon Joseph, B.; John, V. J. *Med. Chem.* **2004**, *47*, 158–164.
7. Maillaird, M.; Hom, C.; Gailunas, A.; Jagodzinska, B.; Fang, L. Y.; John, V.; Freskos, J. N.; Pulley, S. R.; Beck, J. P.; Tenbrink, R. E., WO2002002512, **2002**.
8. Coburn, C. A.; Stachel, S. J.; Jones, K. G.; Steele, T. G.; Rush, D. M.; DiMuzio, J.; Pietrak, B. L.; Lai, M. T.; Huang, Q.; Lineberger, J.; Jin, L.; Munshi, S.; Katharine Holloway, M.; Espeseth, A.; Simon, A.; Hazuda, D.; Graham, S. L.; Vacca, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3635–3638.
9. Schinkel, A. H. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *36*, 179–194.
10. Umbreen, S.; Brockhaus, M.; Ehrenberg, H.; Schmidt, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4585–4595.
11. Braun, H. A.; Meusinger, R.; Schmidt, B. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2551–2554.
12. Kleinman, E. F.; Murray, J. C., WO2006032999, **2006**.
13. Gruninger-Leitch, F.; Schlatter, D.; Kung, E.; Nelbock, P.; Dobeli, H. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4687–4693.
14. Brockhaus, M.; Doebeli, H.; Grueninger, F.; Huguenin, P.; Kitas, E. A.; Nelboeck-Hochstetter, P., US2003125257, **2003**.
15. Rajapakse, H. A.; Nantermet, P. G.; Selnick, H. G.; Munshi, S.; McGaughey, G. B.; Lindsley, S. R.; Young, M. B.; Lai, M. T.; Espeseth, A. S.; Shi, X. P.; Colussi, D.; Pietrak, B.; Crouthamel, M. C.; Tugusheva, K.; Huang, Q.; Xu, M.; Simon, A. J.; Kuo, L.; Hazuda, D. J.; Graham, S.; Vacca, J. P. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7270–7273.
16. Redshaw, S.; Demont, E. H.; Walter, D. S., WO2005058915, **2005**.
17. Siu, J.; Baxendale, I. R.; Ley, S. V. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 160–167.

3.2 Untersuchung der Bindungstasche von NSAID-abgeleiteten γ -Sekretase Modulatoren durch Derivatisierung der Seitenkette und Austausch der Carbonsäurefunktion durch Säureisostere

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits veröffentlicht:

Autoren: Andrea Zall, Daniel Kieser, Nicole Hoettecke, Eva C. Naumann, Binia Thomaszewski, Katrin Schneider, Dirk T. Steinbacher, Robert Schubanel, Stefan Masur, Karlheinz Baumann, Boris Schmidt.

Titel: *“NSAID-driven γ secretase modulation requires an acidic moiety on the carbazole scaffold”.*

Journal: Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2011**, 19, 4903-4909.

Zusammenfassung:

Die Modulation der γ -Sekretase hat Potential für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit. Die meisten NSAIDs abgeleiteten γ -Sekretase Modulatoren tragen als gemeinsames Strukturmerkmal eine Carbonsäurefunktionalität, welche wahrscheinlich die Permeation der Verbindungen durch die Blut-Hirn Schranke beeinflusst. Weiterhin wird eine Interaktion der NSAID-Carbonsäure mit einer basischen Aminosäure, z.B. Lysin624 von APP vermutet sowie die Notwendigkeit eines langen lipophilen Restes, welcher für die Orientierung des Modulators in der Membran verantwortlich zu sein scheint. Aus diesen Gründen wurde eine Struktur-Aktivitäts-Analyse von 34 Carbazolderivaten mit verschiedenen Säureisosteren oder metabolischen Säurevorläufern in einem zellulären Amyloid-Abscheidungs-Assay durchgeführt. Die modulatorische Aktivität wurde nur bei Substanzen mit Säurefunktion und bei metabolisch labilen Estern beobachtet, was die Vermutung, eine Säure-Lysin Interaktion bei diesem Typ von γ -Sekretase Modulatoren, bestätigt.

Die im Rahmen dieser Arbeit projektbezogenen hergestellten Verbindungen:

15, 17, 19, 20, 21, 22, 28, 33, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 56, 57.

Die Durchführung und Auswertung der einzelnen Verbindungen befinden sich in **Kapitel 4.3**.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc



NSAID-derived γ -secretase modulation requires an acidic moiety on the carbazole scaffold

Andrea Zall^a, Daniel Kieser^a, Nicole Höttecke^a, Eva C. Naumann^a, Binia Thomaszewski^a, Katrin Schneider^a, Dirk T. Steinbacher^a, Robert Schubene^b, Stefan Masur^b, Karlheinz Baumann^b, Boris Schmidt^{a,*}

^a Clemens Schöpf-Institute of Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Petersenstr. 22, Darmstadt D-64287, Germany

^b F. Hoffmann-La Roche Ltd, Pharmaceuticals Division, Preclinical Research CNS, Bldg. 70/345, Basel CH 4070, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2011

Revised 21 June 2011

Accepted 22 June 2011

Available online 29 June 2011

Keywords:

Alzheimer's disease

γ -Secretase modulation

Carboxylic acid isosteres

Carprofen

ABSTRACT

Modulation of γ -secretase activity holds potential for the treatment of Alzheimer's disease. Most NSAID-derived γ -secretase modulators feature a carboxylic acid, which may impair blood–brain barrier permeation. The structure activity relationship of 33 carbazoles featuring diverse carboxylic acid isosteres or metabolic precursors thereof was established in a cellular amyloid secretion assay. The modulatory activity was observed for acidic moieties and metabolically labile esters only, which supports our hypothesis of an acid-lysine interaction to be relevant for this type of γ -secretase modulators.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease, it is a devastating illness effecting more than 20 million patients globally. The brain atrophy associated with AD is accompanied by the hallmark amyloid plaques and fibrillary tangles. The plaques consist of aggregated oligomeric amyloid- β -peptides (A β) of various lengths wherein A β ₄₂ is more prone to aggregate than A β ₄₀ or A β ₃₈.¹ These A β -peptides are generated by sequential processing of the amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretase. The γ -secretase complex catalyzes the critical step in the liberation of these A β isoforms, and is thus a promising target in the prevention of AD. The membrane located γ -secretase-complex consists of four proteins: nicastrin (Nct), anterior-pharynx defective-1 (Aph-1), presenilin enhancer (Pen-2) and presenilin (PS1 or PS2).² PS1 is a nine transmembrane domain (TMD) protein which bears two catalytic aspartates Asp²⁵⁷ and Asp³⁸⁵ in the transmembrane domains 6 and 7.^{3–5} These catalytic domains cleave APP within the membrane, implicating an unusual regulated intramembrane proteolysis (RIP) in the lipophilic membrane.^{6–8}

Several inhibitors for this process have been reported recently.⁷ However, most of these inhibit the cleavage of other γ -secretase substrates such as Notch, which is responsible for cell proliferation. Some NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) show a partial inhibition, the so called modulation of the γ -secretase cleavage,

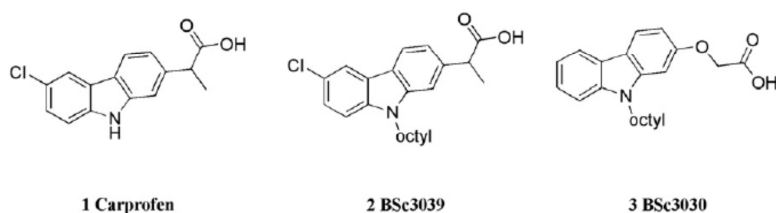
which is characterized by increased A β ₃₈ secretion and decreased A β ₄₂ secretion.⁹ Photoaffinity labeling experiments with an *R*-flurbiprofen derivative suggest a binding site for NSAID-derived γ -secretase modulators directly on the substrate APP close to the GxxxG region,^{10,11} which is responsible for substrate dimerization and may control the processing by γ -secretase.¹⁸ We suggested an interaction of the NSAID's carboxylic acid with a basic amino acid, for example, lysine⁶²⁴ on APP, which is located in the vicinity of the GxxxG motif, at the membrane interface.¹² We reported on lipophilic *N*-alkylated carprofen-derivatives and *N*-sulfonylated or *N*-alkylated carbazolyloxyacetic acids which are structurally related to the substrate targeting γ -secretase modulator flurbiprofen (sGSMs).^{13,14} The *N*-alkyl chain strongly enhances the modulator activity; this may be partially due to modulator orientation via a membrane anchoring effect (Scheme 1). The structural differences between acidic NSAID derived GSMs and the basic GSMs¹⁷ stimulated us to explore the structure activity relationship of the carboxylic acid. This acid may interact with the substrate and thereby influence the positioning of the substrate in relation to PS1, which has been shown to be crucial for the cleavage event.¹⁹

2. Methods and results

Herein we report the replacement of the carboxylic acid on carprofen-derived GSMs **2** (IC₅₀(A β ₃₈) = not determined at max concn 100 μ M, IC₅₀(A β ₄₀) >40 μ M, IC₅₀(A β ₄₂) = 6.9 μ M) and **3** (EC₅₀(A β ₃₈) = 24 μ M, IC₅₀(A β ₄₀) >40 μ M, IC₅₀(A β ₄₂) = 19 μ M) by carboxylic acid isosteres and carboxylic acid derivatives. This

* Corresponding author.

E-mail address: Schmidt_boris@mac.com (B. Schmidt).



Scheme 1. Carprofen (**1**)⁹ is the GSM-lead structure of **2** and **3**.¹⁴

replacement aimed to reduce the topological polar surface area and the amphiphilicity of the lipophilic acids. This was expected to effect the blood–brain barrier (BBB) permeation.^{13,14} Carboxylic acid isosteres require related environments as the carboxylic acid for target binding and thus some of them were expected to display γ -secretase modulatory effects. We chose several established carboxylic acid isosteres such as tetrazole, sulfonic acid, amides, sulfone amides and tetronates. We included alcohols, nitriles and amines as controls to obtain either straight or inverse γ -secretase modulators. In addition, we explored the modulator binding site by the introduction of sterically demanding groups. The synthesis was carried out according to Scheme 2 (explicit synthesis: see Section 3 and Supplementary data). The amphiphilicity of these alkylated acids may result in micelle formation at higher concentration, therefore the dose response evaluation was limited to a max concn of 100 μ M. This max concn excluded the IC_{50}/EC_{50} determination of less active compounds. However, the shape of the dose response (see Supplementary data for examples) allowed us to classify the compounds as reported in 2006.¹⁴ We observed four different modes of actions in our cellular assay: γ -secretase modulation (increase of $A\beta_{38}$, decrease of $A\beta_{42}$), inverse γ -secretase modulation (decrease of $A\beta_{38}$, increase of $A\beta_{42}$), γ -secretase inhibition (decrease of $A\beta_{38}$, decrease of $A\beta_{42}$) and lack of activity.

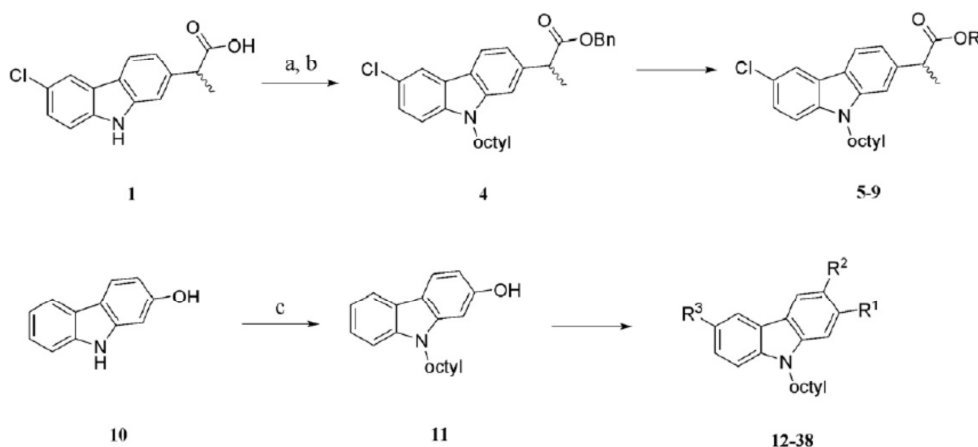
We kept the length of the supposed lipid anchor at eight carbon atoms, making a compromise between lipophilicity and activity, although this anchor does not provide the most active sGSM. The side chain of **3** (BSc3030) bears a methylene spacer, which is an important structural feature as an additional methylene diminished activity. This effect was observed for the carboxylic acid **17** and to a lesser extent for the sulfonic acid **18**. Surprisingly, the dimethylation (**29**) diminished activity, although moderately potent γ -secretase activity modulating fenofibrate-derivatives have been reported.^{12,17} However, the replacement by a salicylic acid

(**19**, Table 1) displayed an $A\beta_{42}$ level reducing effect ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 38 \mu$ M). The salicylic acid locks the extended carbon chain in a Z-configuration resulting in close positioning of the carboxylic acid. Equipotent $A\beta_{42}$ level reducing activity compared to **19** was achieved by a tetronic acid (**20**) and a tetramic acid (**21**), which are rarely employed as carboxylic acid isosteres. Only a sterically more demanding tetramate (**22**) displayed a full inhibitory mode of action (Scheme 3).

On the contrary, the established isosteres: tetrazole (**24**) or the 2,2,2-trifluoroethanol (**12**) did not affect γ -secretase activity up to a concentration of 100 μ M or even caused increased $A\beta_{42}$ secretion. The linear alcohol **23** and bromide **13** were inactive. However, the α -branched alcohol **8** increases $A\beta_{42}$ secretion. The amines (**25**, **30–32**) did not show modulatory activity. The nitrile (**14**) caused increased $A\beta_{42}$ secretion, whereas the amide (**36**) and the acidic sulfonimide (**9**) showed reduction of the $A\beta_{42}$ level. These results indicate the necessity of an acidic moiety on this scaffold to achieve modulatory activity. This supports our hypothesis that modulators interact with a basic amine on the substrate, because all GSMs of this series exhibit a pK_a value in the range of 2–5.

Additional substituents in the C-3 position of **3** revealed a tolerance for small functional groups like an aldehyde (**33**), but an additional propionic acid side chain (**37**) diminished activity (Scheme 4). These findings suggest a defined binding pocket for the modulators.

The methyl ester **15** displayed unexpected $A\beta_{42}$ level reducing activity (Table 2, entry 4, $IC_{50}(A\beta_{42}) = 27 \mu$ M), a marginal loss in activity compared to the carboxylic acid **3** with an IC_{50} for $A\beta_{42}$ of 19 μ M. Further investigation confirmed the tolerance of short linear esters. However, the activity decreased with increasing length of the ester. The ethyl ester **34** showed $A\beta_{42}$ level reducing activity ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 31 \mu$ M), but *iso*-propyl (**35**) or *iso*-butyl ester (**26**) did not reduce $A\beta_{42}$ secretion. On the contrary, the tertiary



Scheme 2. Reagents: General synthesis of the carbazole derivatives. (a) Benzylbromide, K_2CO_3 , acetone, rt; (b) octylbromide, NaH, THF, 0 °C–rt; (c) octylbromide, NaH, THF, and 0 °C–rt.

Table 1
Activity of *N*-octylcarprofen and *N*-octylcarbazole derivatives

Entry	Compd	Mode of action	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ /EC ₅₀ μM		
						Aβ ₃₈	Aβ ₄₀	Aβ ₄₂
1	5	iGSM		H	Cl	n.d. ^c	n.d. ^c	50 ^a
2	8	iGSM		H	Cl	n.d.	n.d. ^c	21 ^a
3	9	GSM		H	Cl	n.d.	n.d. ^c	32 ^a
4	11	GSI		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80
5	12	iGSM		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	12 ^a
6	13	iGSM		H	H	>40	>40	>40
7	14	GSI		H	H	74	105	252 ^b
8	17	GSM		H	H	>80 ^a	>80	>80 ^b
9	18	GSM		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80 ^b
10	19	GSM		H	H	23 ^a	>80	38 ^b
11	20	GSM		H	H	21 ^a	>80	37 ^b
12	21	GSM		H	H	8 ^a	72	28 ^b
13	22	GSI		H	H	31	32	24
14	23	iGSM		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>40
15	24	GSI		H	H	165 ^b	102 ^b	113 ^b
16	25	iGSM		H	H	>80	>80	>80 ^a
17	29	GSM		H	H	>40 ^a	>40	>40
18	30	iGSM		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>10 ^a
19	31	GSM		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80

(continued on next page)

Table 1 (continued)

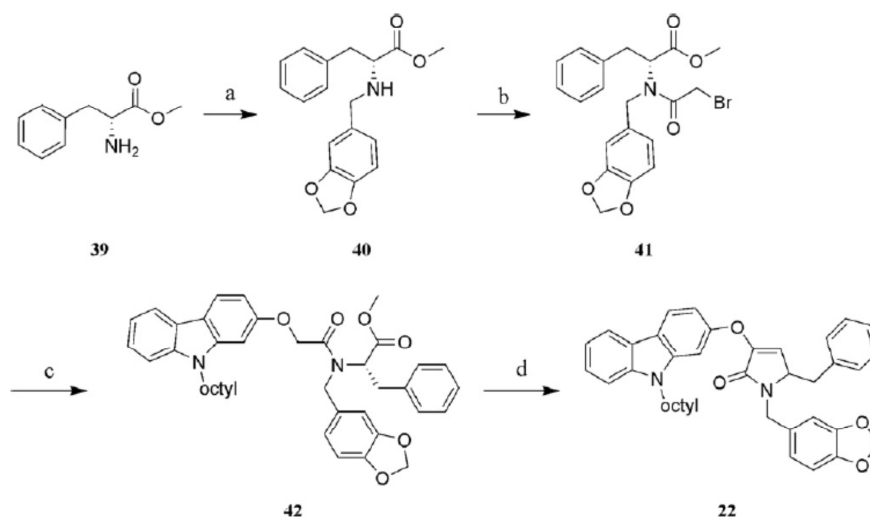
Entry	Compd	Mode of action	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ /EC ₅₀ μM		
						Aβ ₃₈	Aβ ₄₀	Aβ ₄₂
20	32	GSI		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80
21	33	GSM			H	n.d. ^c	n.d. ^c	32
22	37	GSM			H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80
23	38	GSI			H	n.d. ^c	n.d. ^c	80
24	36	GSI		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	104

Modulators (GSM) display increased production of Aβ₃₈ (EC₅₀) and reduction of Aβ₄₂ (IC₅₀). Inverse modulators (IGSM) display increased production of Aβ₄₂ (EC₅₀) and reduction of Aβ₃₈ (IC₅₀). γ-secretase inhibitors (GSI) reduce Aβ₃₈ and Aβ₄₂.

^a EC₅₀ values are displayed.

^b IC₅₀ values are displayed.

^c Not determinable at max concn: 100 μM.

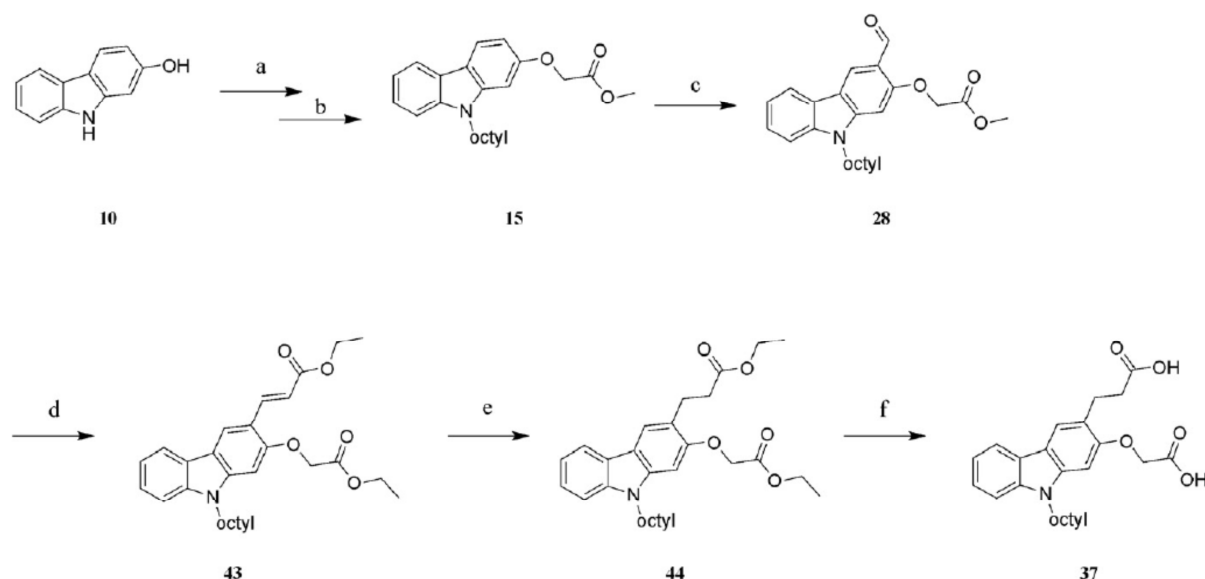


Scheme 3. Reagents: Synthesis of the higher substituted tetramate (22). (a) Piperonal, Na(AcO)₃BH, DCE, rt, 5 h; (b) bromoacetyl bromide, TEA, DCM, rt, 2.5 h; (c) 11, K₂CO₃, acetone, rt; (d) KOtBu, THF, rt.

butyl ester (16) increased Aβ₄₂ levels at EC₅₀ = 19 μM. Equally the phosphonic diethyl ester (27) caused an increased Aβ₄₂ secretion with an EC₅₀ (Aβ₄₂) = 13 μM. These findings suggest a metabolic activation related to fenofibrate hydrolysis, for example, an esterase releasing the active carboxylic acid. This hydrolysis seems to tolerate short linear esters as substrates. This presumption was confirmed by investigation of the α-branched side chain of carprofen esters (4, 6, and 7), which inhibit or inversely modulate γ-secretase activity. Consequently, short α,α'-linear esters fulfill criteria for a fenofibrate analog prodrug system in this cellular assay. This potential prodrug system is still under investigation. Finally, an additional aldehyde in the C-3 position (28) of the methyl ester was not tolerated and resulted in straight γ-secretase inhibition. All attempts to hydrolyze the phosphonic ester (27) resulted in decomposition, excluding the resulting acid from the investigation.

The brain permeability of carboxylic acids is regarded with suspicion despite the identification of the MCT-1 transporter in human brain.²³ Therefore we decided to challenge the paradigm of poor brain permeability of such acids and selected the lead

carprofen derivative 45 (Fig. 1, IC₅₀ Aβ₄₂ = 2.9 μM, IC₅₀ Aβ₄₀ >40 μM, IC₅₀ Aβ₃₈ = 5.8 μM).¹⁴ It does not interfere with γ-secretase cleavage activity at the ε-site as determined by de novo production of AICD.¹⁴ This indicated that 45 may not exert Notch inhibition at the required physiological concentration. The ratio of the carprofen concentrations in plasma (AUC_F) versus cerebrospinal fluid (AUC_{CSF}) over time was reported for rats (AUC_R = AUC_{CSF}: AUC_F = 0.23), this relates to an AUC_R = 5.31 for flurbiprofen.²⁰ Moreover, Péhourcq et al. observed a parabolic relationship for brain permeation and the lipophilicity of deprotonated NSAIDs. This relationship stimulated us to select C-10-derivative 45 for in vivo evaluation while the SAR study of the acid derivatives was ongoing. Indeed, 45 showed a slow, yet significant BBB permeation in APP_{swe} Tg mice at a single 10 mg/kg oral dosage suspended in NaCl and gelatine. The plasma and brain concentration of the modulator were monitored over a period of 5 h. The brain concentration was found to continuously increase to a plasma/brain ratio of approximately 2:1 (Fig. 1). The AUC_R <0.1 indicates reduced brain permeation versus carprofen. Moreover, the significant brain levels of the acid 45 do not imply localization of the compound at



Scheme 4. Reagents: Synthesis of C3-substituted carbazole **37**. (a) Octyl iodide, NaH, THF, DMF, -70°C –rt, 12 h; (b) bromoacetic acid methylester, K_2CO_3 , acetone, rt, 12 h; (c) *N,N*-diisopropylformamide, POCl_3 , H_2O , DCE, 80°C , 2–5 d; (d) phosphonium salt, NaOEt, EtOH, 80°C , 20 h; (e) Pd/C, H_2 , EtOH, HCl, rt, 24 h; (f) KOH, MeOH, rt/ 64°C , 2 d.

the site required for modulatory activity. Furthermore, no significant $\text{A}\beta_{42}$ changes were observed at this timepoint. These unchanged $\text{A}\beta$ levels were linked to the double transgenic mice exhibiting NSAID-resistant PS1 mutations recently.^{15,16} This lack of activity in murine cell lines was reported for several first generation γ -secretase modulators and PS1 mutations both by Weggen et al.²¹ and Steiner et al.²² Thus the less potent and even more lipophilic carbazole derivatives were excluded from evaluation in this mouse model.

Our findings indicate the necessity of an acidic moiety in a pKa-range of 2–5 on this class of γ -secretase modulators. This small pKa-range supports our hypothetical interaction with lysine⁶²⁴. The location of this lysine, directly at the membrane interface close to the GxxxG dimerization motif, suggests a modulation mechanism as an APP dimerization inhibitor or impacts substrate orientation in the membrane¹⁹, shifting the cleavage site to the less toxic $\text{A}\beta_{38}$. The optimum spacer length between the aryl backbone and carboxylic acid was determined to be 2–3 carbon or oxygen atoms. However, introduction of a rigid aryl spacer allowed an elongation of up to four atoms. We identified a potential prodrug system based on short linear esters, which complements the BBB permeation of the free acid **45**.

3. Experimental

3.1. General experimental informations

The ^1H and ^{13}C spectra were recorded on a Bruker AC 300 (300 MHz) and AC 500 (500 MHz) spectrometer. Chemical shifts are reported in δ (ppm) adjusted to the central line of the deuterated solvent (MeOD, CDCl_3 , d_6 -DMSO, Acetone- d_6). Mass spectrometry was performed on a Bruker-Franzen Esquire LC mass spectrometer (ESI) and a double focused MAT 95 (EI). HPLC analysis was performed on an Agilent 1100 system.

3.2. Purity determination

Analytical reversed phase high-performance liquid chromatography was performed on an Agilent 1100 HPLC system, equipped

with an auto sampler. The purity of the final compounds was determined using UV detection ($\lambda = 254 \text{ nm}$). The chromatographic method employed the following: column Zorbax Eclipse XDB-C18; $4.6 \times 150 \text{ mm}$; mobile phase A H_2O (0.1% TFA), mobile phase B acetonitrile, flow rate 1 mL/min, gradient elution 30–100% B over 15 min. According to these methods the purities for all compounds were $\geq 95\%$ if not indicated otherwise in the experimental details.

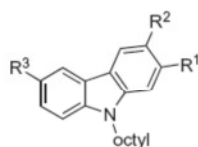
The in vitro measurements were performed on a cellular $\text{A}\beta$ lowering assay, in H4 APP $\Delta 9$ cells to evaluate the compounds for their potency to modulate $\text{A}\beta$ secretion. We used the $\text{A}\beta$ liquid phase electrochemiluminescence (LPECL) assay to measure $\text{A}\beta$ isoforms.^{12,13} Cell viability was measured by a colorimetric cell proliferation assay (CellTiter 96TM AQ assay, Promega) utilizing the bio-reduction of MTS (Owen's reagent) to formazan.

See [Supplementary data](#) for details of the in vivo mouse experiments.

3.3. 2-Hydroxy-*N*-octylcarbazole **11**

To a suspension of NaH (0.82 g, 20.48 mmol) in THF (20 mL) under argon atmosphere was added 2-hydroxycarbazole (1.50 g, 8.19 mmol) at a temperature of 0°C . After 30 min stirring octylbromide (1.50 g, 7.78 mmol) was added and the reaction mixture was allowed to warm to rt. After 12 h the reaction mixture was quenched by drop wise addition of H_2O until gas formation ceased. The obtained mixture was extracted three times with CH_2Cl_2 (30 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , concentrated in vacuo and purified by silica gel column chromatography (gradient starting with cyclohexane to cyclohexane: CH_2Cl_2 1:2) to give 1.58 g (74%) of **11** (BSc4029) as a colorless solid.

HPLC: 9.2 min (96%), ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.96$ (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1H), 7.90 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.34 (m, 1H), 7.19 (td, $J = 7.0, 1.2 \text{ Hz}$, 1H), 6.82 (d, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H), 6.72 (dd, $J = 8.3, 2.2 \text{ Hz}$, 1H), 4.81–5.43 (b.s., 1H), 4.18 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H), 1.82 (q, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H), 1.20–1.41 (m, 10H), 0.86 (t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 3H) ppm, ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 154.7, 141.9, 140.6, 124.4, 123.0, 121.2, 119.4, 118.9, 116.9, 108.4, 108.0, 95.0, 43.1, 31.8, 29.4, 29.2, 28.8, 27.3, 22.6$, and 14.1 ppm , MS (m/z , 70 eV, ESI) = 318.4 [M+Na].

Table 2Activity of *N*-octylcarbazole and *N*-octylcarprofen esters

Entry	Compd	Mode of action	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ /EC ₅₀ μM		
						Aβ ₃₈	Aβ ₄₀	Aβ ₄₂
1	4	GSI		H	Cl	n.d. ^b	n.d. ^b	>80
2	6	iGSM		H	Cl	n.d. ^b	n.d. ^b	15 ^a
3	7	iGSM		H	Cl	n.d. ^b	n.d. ^b	21 ^a
4	15	GSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	27
5	16	iGSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	19 ^a
6	26	GSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	>80
7	27	iGSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	13 ^a
8	28	GSI			H	n.d. ^b	n.d. ^b	89
9	34	GSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	31
10	35	iGSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	49 ^a

Modulators (GSM) display increased β production of A₃₈ (EC₅₀) β and reduction of A₄₂ (IC₅₀). Inverse modulators (iGSM) display increased production of A₃₈ (EC₅₀) β and reduction of A₄₂ (IC₅₀). β-Secretase inhibitors (GSI) reduce A₃₈ β and A₄₂.

^a EC₅₀ values are displayed.

^b Not determinable at max concn: 100 μM.

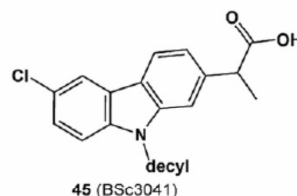
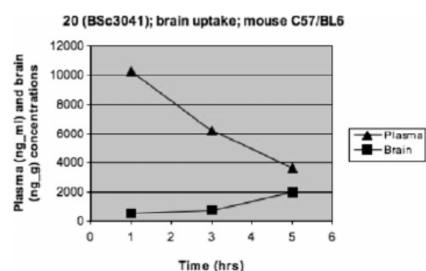


Figure 1. 45 (BSc3041) Penetrate the BBB in C57/BL6 mice at an oral dosage of 10 mg/kg.

3.4. 2-(2-Bromoethoxy)-9-octyl-9H-carbazole 13

According to general procedure for ether formation (see [Supplementary data](#)): **11** (BSc4029) (0.100 g, 0.34 mmol), 1,2-dibromo-

ethane (0.180 g, 0.97 mmol) and K₂CO₃ (0.141 g, 1.02 mmol), acetone (30 mL) yield 80 mg (51%) **13** as colorless solid.

HPLC: 10.8 min (98%), ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.01 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.44–7.35 (m, 2H),

7.24–7.19 (m, 1H), 6.90 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.85 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H), 4.43 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.23 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.74–3.69 (m, 2H), 1.90–1.82 (m, 2H), 1.44–1.23 (m, 10H), 0.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H) ppm, ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 157.3, 141.6, 140.7, 124.6, 122.9, 121.1, 119.6, 118.9, 117.5, 109.5, 107.3, 94.8, 68.6, 43.1, 31.8, 29.4, 29.3, 29.2, 28.8, 27.3, 22.6$, and 14.0 ppm.

3.5. 2-(9-Octyl-9H-carbazol-2-yloxy)-ethanesulfonic acid **18**

To a solution of **13** (BSc4004) (0.020 g, 0.05 mmol) in a mixture of H_2O (0.050 mL) and dioxane (0.050 mL) was added Na_2SO_3 (0.032 g, 0.25 mmol) and the resulting mixture was heated at 160°C under microwave irradiation until the reaction was completed (TLC control). The reaction mixture was concentrated in vacuo, the resulting solid dissolved in EtOH_{abs} and concentrated in vacuo to give 0.007 g (35%) of **18** (BSc4079) as a colorless solid. HPLC: 7.0 min (93%), ^1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 7.97\text{--}7.94$ (m, 1H), 7.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.37–7.30 (m, 1H), 7.18–7.10 (m, 1H), 6.84 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.53–4.47 (m, 2H), 3.38–3.33 (m, 2H), 1.89–1.81 (m, 2H), 0.86 (m, 10H), 1.32–1.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H) ppm, ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD): $\delta = 143.1, 142.0, 125.3, 124.3, 121.8, 120.2, 119.8, 118.2, 109.7, 109.1, 100.5, 95.2, 65.3, 51.9, 43.7, 32.9, 30.7, 30.3, 29.9, 28.2, 23.6$, and 14.4 ppm, MS (m/z , 70 eV, ESI) = 402 [M $^-$].

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmc.2011.06.062.

References and notes

- Behr, D.; Wrigley, J. D.; Owens, A. P.; Shearman, M. S. *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 563.
- Wolfe, M. S. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7931.
- Kaether, C.; Haass, C.; Steiner, H. *Neurodegener. Dis.* **2006**, *3*, 275.
- Brunkan, A. L.; Goate, A. M. *J. Neurochem.* **2005**, *93*, 769.
- Kimberly, W. T.; Xia, W.; Rahmati, T.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 3173.
- Steiner, H.; Fluhrer, R.; Haass, C. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29627.
- Schmidt, B.; Baumann, S.; Braun, H. A.; Larbig, G. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 377.
- Brown, M. S.; Ye, J.; Rawson, R. B.; Goldstein, J. L. *Cell* **2000**, *100*, 391.
- Weggen, S.; Eriksen, J. L.; Das, P.; Sagi, S. A.; Wang, R.; Pietrzik, C. U.; Findlay, K. A.; Smith, T. E.; Murphy, M. P.; Bultter, T.; Kang, D. E.; Marquez-Sterling, N.; Golde, T. E.; Koo, E. H. *Nature* **2001**, *414*, 212.
- Kukar, T. L.; Ladd, T. B.; Bann, M. A.; Fraering, P. C.; Narlawar, R.; Maharvi, G. M.; Healy, B.; Chapman, R.; Welzel, A. T.; Price, R. W.; Moore, B.; Rangachari, V.; Cusack, B.; Eriksen, J.; Jansen-West, K.; Verbeeck, C.; Yager, D.; Eckman, C.; Ye, W.; Sagi, S.; Cottrell, B. A.; Torpey, J.; Rosenberry, T. L.; Fauq, A.; Wolfe, M. S.; Schmidt, B.; Walsh, D. M.; Koo, E. H.; Golde, T. E. *Nature* **2008**, *453*, 925.
- Munter, L. M.; Voigt, P.; Harmeier, A.; Kaden, D.; Gottschalk, K. E.; Weise, C.; Pipkorn, R.; Schaefer, M.; Langosch, D.; Multhaup, G. *EMBO J.* **2007**, *26*, 1702.
- Baumann, S.; Hoettecke, N.; Schubnel, R.; Baumann, K.; Schmidt, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6986.
- Narlawar, R.; Perez Revuelta, B. I.; Baumann, K.; Schubnel, R.; Haass, C.; Steiner, H.; Schmidt, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 176.
- Narlawar, R.; Perez Revuelta, B. I.; Haass, C.; Steiner, H.; Schmidt, B.; Baumann, K. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7588.
- Cziri, E.; Leuchtenberger, S.; Dörner-Ciossek, C.; Schneider, A.; Jucker, M.; Koo, E. H.; Pietrzik, C. U.; Baumann, K.; Weggen, S. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 24504.
- Page, R. M.; Baumann, K.; Tomioka, M.; Perez-Revuelta, B. I.; Fukumori, A.; Jacobsen, H.; Flohr, A.; Luebbbers, T.; Ozmen, L.; Steiner, H.; Haass, C. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 677.
- Oehlrich, D.; Berthelot, D. J. C.; Gijzen, H. J. M. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 669.
- Richter, L.; Munter, L.-M.; Ness, J.; Hildebrand, P. W.; Dasari, M.; Unterreitmeier, S.; Bulic, B.; Beyermann, M.; Gust, R.; Reif, B.; Weggen, S.; Langosch, D.; Multhaup, G. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 14597.
- Uemura, K.; Farnier, K.; Nasser-Ghodsi, N.; Jones, P.; Berezovska, O. *Mol. Neurodegeneration* **2011**, *6*, 15.
- Péhourecq, F.; Matoga, M.; Bannwarth, B. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2004**, *18*, 65.
- Hahn, S.; Bruening, T.; Ness, J.; Cziri, E.; Baches, S.; Gijzen, H.; Korth, C.; Pietrzik, C. U.; Bulic, B.; Weggen, S. *J. Neurochem.* **2011**, *116*, 385.
- Kretner, B.; Fukumori, A.; Gutsmedl, A.; Page, R. M.; Luebbbers, T.; Galley, G.; Baumann, K.; Haass, C.; Steiner, H. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 15240.
- Chiry, O.; Pellerin, L.; Monnet-Tschudi, F.; Fishbein, W. N.; Merezinskaya, N.; Magistretti, P. J.; Clarke, S. *Brain Res.* **2006**, *1070*, 65.

3.3 Bepridilderivate modulieren die Alzheimer assoziierte γ -Sekretase

Dieses Kapitel wird vorbehaltlich der Annahme durch den FB Chemie nach Annahme zur Publikation gegen das angenommene Manuskript ausgetauscht.

Autoren: Andrea Zall, Stefan F. Lichtenthaler, Stefan Mitterreiter, Boris Schmidt.

Titel: *“Bepridil derivatives modulate Alzheimer’s associated γ secretase”.*

Journal: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

Zusammenfassung:

Sowohl die β -Sekretase als auch die γ -Sekretase sind wichtige Targets zur Behandlung der Alzheimer-Demenz. Bepridil und Amiodarone, beides Medikamente die zur Behandlung von Herzerkrankungen eingesetzt werden, weisen einen inhibitorischen Effekt auf die β -Sekretase, als auch einen inversen modulatorischen Effekt gegenüber der γ -Sekretase auf. Durch die Synthese von 19 Bepridil-abgeleiteten Derivaten und deren Struktur-Aktivitätsbeziehung wurde der inverse modulatorische Effekt in einen normalen modulatorischen Effekt umgewandelt. Ein Effekt auf die β -Sekretase Spaltung wurde nicht beobachtet.

Dabei wurde Bepridil zum einen an den beiden Aromaten unter Erhalt der *isobutyl*-Gruppe derivatisiert zum anderen unter Beibehaltung des aromatischen Gerüsts und Substitution der *isobutyl*-Gruppe durch Carbonsäuren. Die Derivatisierung am Aromaten mit unterschiedlichen Substituenten führte zu inversen γ -Sekretase Modulatoren. Erst die Einführung einer Carbonsäurefunktion statt der *isobutyl*-Gruppe unter Beibehaltung der beiden Aromaten führte zu normalen γ -Sekretase Modulatoren **12**, **16** und somit zu einer Reduktion von A β 42. Überraschenderweise zeigte Verbindung **14** trotz der Carbonsäure keinerlei Effekt auf die γ -Sekretase, was dafür sprechen würde, dass diese Verbindung aufgrund des zusätzlichen Stickstoffs nicht mehr zellpermeabel ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit projektbezogenen hergestellten Verbindungen:

4, 5, 6a, 6b, 6c, 6d, 6e, 6f, 7a, 7b, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16.

Die Durchführung und Auswertung der einzelnen Verbindungen befinden sich in **Kapitel 4.4**.

Bepridil derivatives modulate Alzheimer's disease associated γ -secretase

Andrea Zall^a, Stefan F. Lichtenthaler^b, Stefan Mitterreiter^b, Boris Schmidt^{a,*}^aClemens Schöpf-Institute of Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Petersenstr. 22, Darmstadt D-64287, Germany^bGerman Center for Neurodegenerative Diseases Munich and Adolf Butenandt-Institute, Biochemistry, University of Munich, Munich D-80336, Germany

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article history:

Received

Revised

Accepted

Available online

Type your Abstract text here

2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords:

Alzheimer's disease

 γ -Secretase modulation

Bepridil

Keyword_4

Keyword_5

Alzheimer's disease (AD) is the common neurodegenerative disorder, affecting approximately 5% of the population over 65 year in Europe. According to the World Health Organization, an estimated 35.6 million people worldwide currently have dementia, increasing to 65.7 million by 2030 and 115.4 million by 2050.^[1]

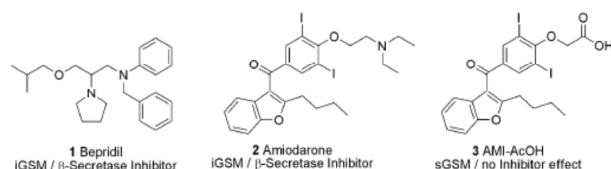
The amyloid hypothesis, still a major concept for AD therapy, is based on the formation and accumulation of the amyloid- β -peptide (A β) in the central nervous system (CNS).^[2] The β - and γ -secretase generate A β -proteins by proteolytic cleavage of the membrane-bound amyloid precursor protein (APP). The α -secretase, another protease, cleaves APP via the non-amyloidogenic pathway, which requires subsequent processing by the γ -secretase to release the pathologically safe p3 peptide. The β -secretase is a type 1 membrane protein and cleaves APP in the extracellular domain near the transmembrane domain (TMD) and releases an extracellular soluble fragment sAPP β and a membrane-bound intracellular peptide fragment C99, which is processed further on by the γ -secretase. The proteolytic cleavage of C99 leads to the formation of A β -peptides, which accumulate in the extracellular space. The γ -secretase belongs, due to the conserved motif GXGD, to the signal peptide peptidases and is a high molecular complex consisting of at least four different proteins: presenilin (PS), nicastrin, presenilin enhancer-2 (Pen-2), and anterior pharynx defective 1 (Aph-1).^[3] It cleaves the A β -sequence at different positions and the resulting peptides differ at their C-terminus in length. The dominant peptides generated are

the A β 40-peptide (80-90%), followed by A β 42-peptide (5-10%) and other smaller peptides such as A β 38 and A β 37. Since A β 42 aggregates readily, it is considered pathological and therefore a key component in the pathogenesis of AD.^[4] Both secretases, β -secretase as well as γ -secretase are still important targets for the treatment of AD despite the failure of clinical trials. The inhibition of β -secretase and the modulation of the γ -secretase are key starting points in search of drug discovery programmes.^[5]

Recently Lichtenthaler *et al.* reported on a new class of β -secretase inhibitors, which are also γ -secretase modulators; bepridil (**1**) and amiodarone (**2**), both are approved drugs for the treatment of cardiovascular diseases. They could show that these drugs have an inhibitory effect on the β -secretase as well as an inverse modulatory effect on γ -secretase activity. They postulate, that the inhibition of β -secretase is based on an increase of the endosomal pH at therapeutically achievable concentrations in cultured cells, in primary neurons and *in vivo* in guinea pigs. Additionally, bepridil (**1**) and amiodarone (**2**) modulate γ -secretase cleavage, but as inverse modulators, resulting in the increased generation of A β 42 peptides, while the generation of A β 38 peptides was found to be reduced. Furthermore, it was shown that the substitution of nitrogen on amiodarone (**2**) by a carboxylic acid moiety **3** transferred the inverse modulatory effect into a straight modulatory effect (Scheme 1).^[6]

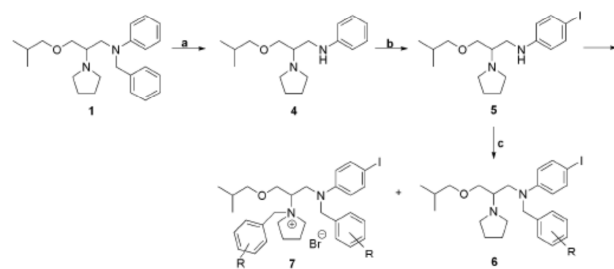
* Corresponding author. Tel.: +49 6151 164531; fax: +49 6151 163278

E-mail address: schmidt_boris@t-online.de (B. Schmidt).



Scheme 1. Bepridil (1), Amiodarone (2) and AMI-AcOH (3).

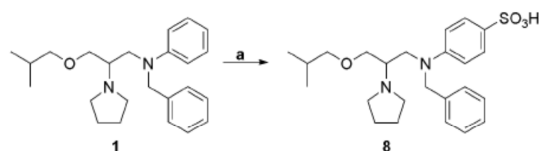
Motivated by these results, we decided to investigate a series of bepridil derivatives as outlined in Scheme 2. Initially, the benzyl group of bepridil (1) (isolated from Unicordium® tablets 300 mg) was removed by hydrogenation and product 4 was thus obtained. The subsequent iodination of the phenyl ring in the *para*-position to product 5 was selective, using the Kajigaeshi reagent. *N*-Arylation of 5 was carried out using K₂CO₃, various bromobenzene derivatives in acetone or acetonitrile and furnished the desired product 6. Product 7 was obtained as a by-product.



Entry	Compound	R
1	5	-
2	6a	H
3	6b	4- <i>tert</i> butyl
4	6c	4-nitrile
5	6d	4-phenyl-4-carbonitrile
6	6e	3-fluoryl
7	6f	4-acetic acid
8	7a	H
9	7b	4- <i>tert</i> butyl

Scheme 2. Synthesis of substituted bepridil derivatives. Reagents and conditions: (a) H₂, Pd/C, HCl conc., EtOH, rt, 30 h, 99%, (b) BTMAICl₂, CaCO₃, DCM/MeOH, rt, 30 h, 100%, (c) RC₆H₄CH₂Br, K₂CO₃, acetone or acetonitrile, rf-rt, 4-24 h, 24-88%.

The bepridil derivative 8 was synthesized according to Scheme 3 to evaluate the contribution of a sulfonic acid in the *para*-position of the phenyl ring. Bepridil (1) was treated with chlorosulfonic acid and heated for 30 min at reflux to yield product 8.

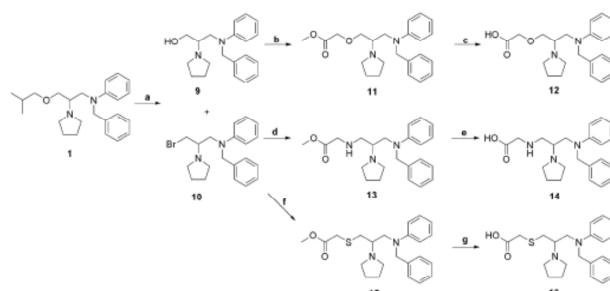


Scheme 3. Synthesis of X: Reagents and conditions: (a) HSO₃Cl, DCE, rf, 30 min, 92%.

We prepared the bepridil-derivatives 12, 14, 16 as shown in Scheme 4, in order to investigate the impact of a carboxylic acid on the activity of β- and γ-secretase.

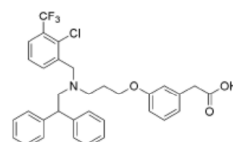
Two aryl substituents of bepridil were kept unmodified in this series in order to ensure membrane insertion. Instead, the *isobutyl* group was removed and replaced by a carboxylic acid,

which has been shown to convert the iGSM-effect into a sGSM-effect on 3 scaffolds already.^[7] The insertion of an additional amino group should keep the overall charge of the molecule at +1 and raise the pH in the endosomes, which should lead to an inhibition of β-secretase. We started the synthesis of compounds 12, 14 and 16 from the isolated bepridil (1). The cleavage of the *o*-*isobutyl* group with BBr₃ in dry DCM afforded the alcohol 9 and the bromide 10 as a by-product. Alcohol 9 was alkylated using NaH and BrCH₂CO₂CH₃ in dry THF at 0°C-rt to give ester 11 and subsequent methyl deprotection by KOH in MeOH furnished the desired compound 12. The esters 13 and 15 results from the nucleophilic substitution of bromide 10 by H₂NCH₂CO₂CH₃ and HSCH₂CO₂CH₃ using K₂CO₃, NaI as base in acetone or acetonitrile under reflux. The hydrolysis by KOH in MeOH afforded the carboxylic acids 14 and 16.



Scheme 4. Synthesis of bepridil derivatives 12, 14, 16: Reagents and conditions: (a) BBr₃, DCM, rt, 12 h, Ar, 35% of 9, 26% of 10, (b) BrCH₂CO₂CH₃, NaH, THF, 0°C-rt, 16 h, 32%, (c) KOH, MeOH, rf, 4 h, 98%, (d) H₂NCH₂CO₂CH₃, K₂CO₃, NaI, acetonitrile, rf, 24 h, Ar, 73%, (e) KOH, MeOH, rf, 18 h, 98%, (f) HSCH₂CO₂CH₃, K₂CO₃, NaI, acetone, rf, 24 h, Ar, 67%, (g) KOH, MeOH, rf, 18 h, 45%.

Due to the structural similarity with the bepridil derivatives, we tested GW 3965, a known LXR agonist, for its effect on γ-secretase activity (Scheme 5).



Scheme 5. Structure of GW 3965.

To investigate the effect of compounds 5, 6a-e and 7a-b on secretases cleavage in detail, HEK 293 APPwt and HEK 293 APPSwe cells were treated for 16 h with the bepridil-derivatives 5, 6a-e, 7a-b, bepridil and with DMSO as a control. Aβ total and individual Aβ levels were determined. The compounds 5, 6a-e and 7a-b inhibit the generation of Aβ in a dose-dependent manner. Compounds 5, 6a-e and 7b turned out to be inverse modulators of γ-secretase, whereas compound 7a displays a sGSM effect (50 μM) (See Fig. 1, 2, 3). We observed that the quaternization of the pyrrolidine causes enhanced toxicity. An effect on the β-secretase cleavage was not observed (data not shown).

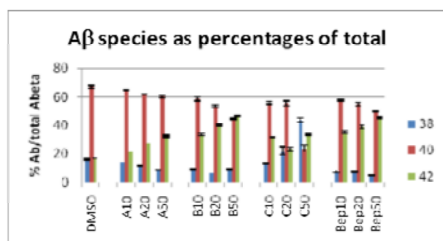


Figure 1. Activity of the compounds 5 (A), 6a (B), 7a (C) and Bepridil at different concentrations.

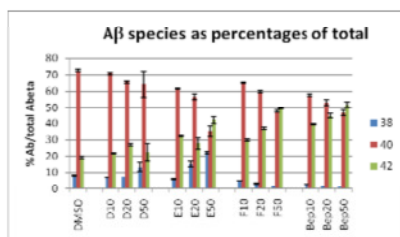


Figure 2. Activity of the compounds 6b (D), 7b (E), 6c (F) and Bepridil at different concentrations.

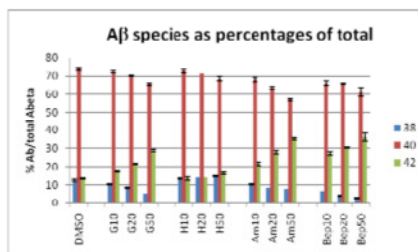


Figure 3. Activity of the compounds 6e (G), 6d (H), Bepridil and Anidaron at different concentrations.

The introduction of the carbonyl acid **6f** in *para*-position of the benzyl ring and the sulfonic acid **8** in the *para*-position of the phenyl ring had no effect on γ - and β -secretase cleavage (See Fig. 4).

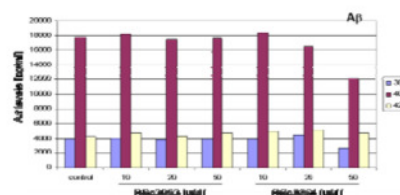


Figure 4. Activity of the compounds 8 (BSc 3963) and 6f (BSc 3964) at different concentrations.

The incorporation of the carboxylic acid on the bepridil scaffold inversed the modulatory activity (**12**, **14**, **16**). The study of compound **12** reveals a sGSM activity (see Fig. 5) and a slight effect on the β -secretase activity (100 μ M). Total A β was found to be reduced by 30% (data not shown). An explanation for this observation may be that the equal negative and positive charges result in species without a total charge. Compound **14** displayed a similar effect as compound **12** (see Fig. 6). Surprisingly, compound **16** showed no effect on β - and γ -secretase activity (See Fig. 7). One reason could be, that the compound is no longer cell permeable. Compound **GW 3956**, a known LXR agonist, displayed the anticipated sGSM activity (See Fig. 7).

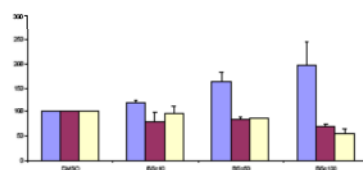


Figure 5. Activity of the compound 12 (BSc 4031) at different concentrations.

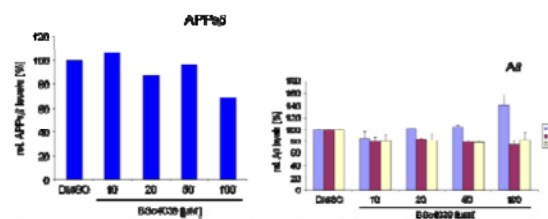


Figure 6. Activity of compound 14 (BSc 4039) at different concentrations.

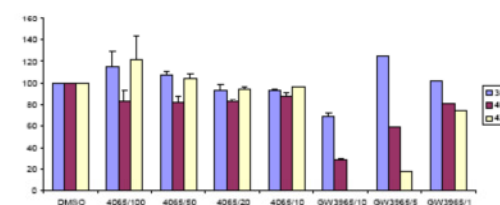


Figure 7. Activity of compound 16 and GW 3965 at different concentrations.

In summary, we have shown that bepridil derivatives represent an interesting class structure of dual active secretase inhibitors/modulators. The substitution of the isobutyl group by a carboxylic acid can be converted the iGSM in a sGSM.

References and notes

- [1] A. Wimo, M. Prince, *Alzheimer's Disease International* **2010**.
- [2] a) J. Hardy, G. Higgins, *Science* **1992**, *256*, 184-185; b) D. J. Selkoe, *Neuron* **1991**, *6*, 487-498.
- [3] H. Steiner, R. Fluhner, C. Haass, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29627-29631.
- [4] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, *297*, 353-356.
- [5] S. Weggen, J. L. Eriksen, P. Das, S. A. Sagi, R. Wang, C. U. Pietrzik, K. A. Findlay, T. E. Smith, M. P. Murphy, T. Bulter, D. E. Kang, N. Marquez-Sterling, T. E. Golde, E. H. Koo, *Nature* **2001**, *414*, 212-216.
- [6] S. Mitterreiter, R. M. Page, F. Kamp, J. Hopson, E. Winkler, H.-R. Ha, R. Hamid, J. Herms, T. U. Mayer, D. J. Nelson, H. Steiner, T. Stahl, U. Zeitschel, S. Rossner, C. Haass, S. F. Lichtenthaler, *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 8974-8983.
- [7] a) R. Narlawar, B. I. Pérez Revuelta, K. Baumann, R. Schubert, C. Haass, H. Steiner, B. Schmidt, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 176-182; b) R. Narlawar, K. Baumann, C. Czech, B. Schmidt, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 5428-5431; c) R. Narlawar, B. I. Pérez Revuelta, C. Haass, H. Steiner, B. Schmidt, K. Baumann, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7588-7591.

3.4 Studien zur Identifizierung der γ -Sekretase-Bindungsstelle

Aufgrund der Membranlokalisation des γ -Sekretase-Komplexes ist es bis heute nicht gelungen, den Komplex zu kristallisieren und somit strukturelle Informationen über die γ -Sekretase-Bindungsstelle zu erhalten. Demnach ist unter anderem die Identifizierung der γ -Sekretase-Bindungsstelle eines der Ziele in der Alzheimer-Forschung, die ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign ermöglicht und so die Entwicklung potentieller Wirkstoffe vorantreibt. Die Methoden, die sich zur Identifizierung von Bindungsstellen eignen, sind Molekulares Modelling, NMR-Bindungsstudien, Kristallstrukturanalysen sowie Photoaffinitätsmarkierungsexperimente. Die Photoaffinitätsmarkierung wurde vor ca. 50 Jahren von Westheimer et al.^[170] entdeckt und stellt bis zum heutigen Tag eine nützliche und verlässliche Methode zur Strukturuntersuchung von Rezeptorbindungsstellen dar. Die Methode hat sich im Laufe der Zeit weiterentwickelt^[171], das Grundprinzip ist jedoch gleich geblieben: eine photosensitive Gruppe, die durch Bestrahlung mit Licht in eine hochreaktive Moleküleinheit zerfällt, wird an einen Liganden gebunden, der dann eine irreversible Bindung mit dem Rezeptor eingeht. Nach erfolgreicher Markierung können die entsprechenden Proteine, Peptide oder Aminosäuren nach Proteolyse, Aufreinigung und Sequenzierung z.B. durch massenspektrometrische Analyse identifiziert werden (Abb. 34).^[172]

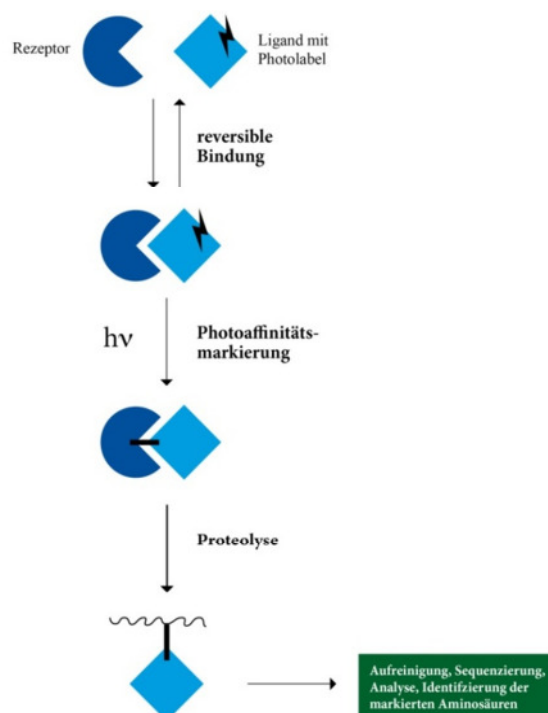


Abb. 34: Schematische Darstellung der Photoaffinitätsmarkierung zur Identifizierung der markierten Einheiten.

Dabei trägt das Photophor zur besseren Identifizierung eine leicht detektierbare Gruppe wie beispielsweise Biotin, eine fluoreszente Einheit oder ein radioaktives Atom. Die drei gebräuchlichsten

photoreaktiven Gruppen, die in der Photoaffinitätsmarkierung eingesetzt werden, sind Arylazide, Diazirine und Benzophenone. Arylazide sind die am häufigsten verwendeten Reagenzien zur Photoaffinitätsmarkierung. Sie wurden 1969 von Knowles et al.^[173] entdeckt und mit unterschiedlichen Substitutionsmustern weiterentwickelt.^[174] Dabei wurde festgestellt, dass der Substituent des Arens die photochemische Reaktion beeinflusst und somit auch die chemische Reaktivität des photochemischen Intermediats.^[175] Arylazide zerfallen unter Lichteinwirkung in hoch reaktive Nitrene, welche dann eine kovalente Bindung mit den nukleophilen Amin-, Thiol- und Hydroxy-Gruppen der umliegenden Aminosäuren eingehen (Abb. 35).

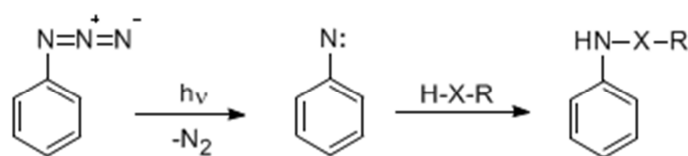


Abb. 35: Zerfall des Arylazids in reaktives Nitren bei der Photoaffinitätsmarkierung.

Arylazide lassen sich relativ leicht aus den entsprechenden Anilinen synthetisieren und sind unter Lichtausschluss chemisch stabil.

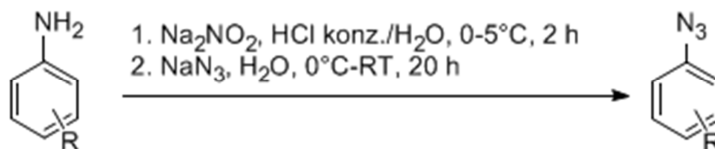


Abb. 36: Allgemeine Synthese für Arylazide.

Vorarbeiten im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Schmidt haben gezeigt, dass Carbazol-Derivate, die einen lipophilen Rest am Carbazol-Amin und eine freie Carbonsäure tragen, potente γ -Sekretase Modulatoren sind^[117] und sich mit der passenden photolabilen Gruppe für Photoaffinitätsexperimente eignen könnten. Weiterhin wurden in der Vergangenheit eine Reihe von photoaktivierbaren, biotinylierten γ -Sekretase-Modulatoren synthetisiert, jedoch waren diese für Markierungsexperimente bedingt geeignet, da zum einen wahrscheinlich der Abstand zwischen der photoreaktiven Einheit und der pharmakophoren Gruppe zu groß (ca. 20 \AA) und zum anderen die Modulation gegenüber der γ -Sekretase nicht ausreichend war.^[116] Das Ziel war demnach die Synthese eines photoaktivierbaren biotinylierten γ -Sekretase-Modulators mit verringertem Funktionsabstand ($< 10 \text{ \AA}$).

Zunächst musste untersucht werden, an welcher Stelle die Photogruppe am Molekül platziert werden kann, ohne die modulierende Wirkung auf die γ -Sekretase zu beeinflussen. Die Aktivität

derartiger Derivate auf die γ -Sekretase lässt sich anhand von Verbindung **61** (**BSc2911**) abschätzen ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 88 \mu M$) (Abb. 37).

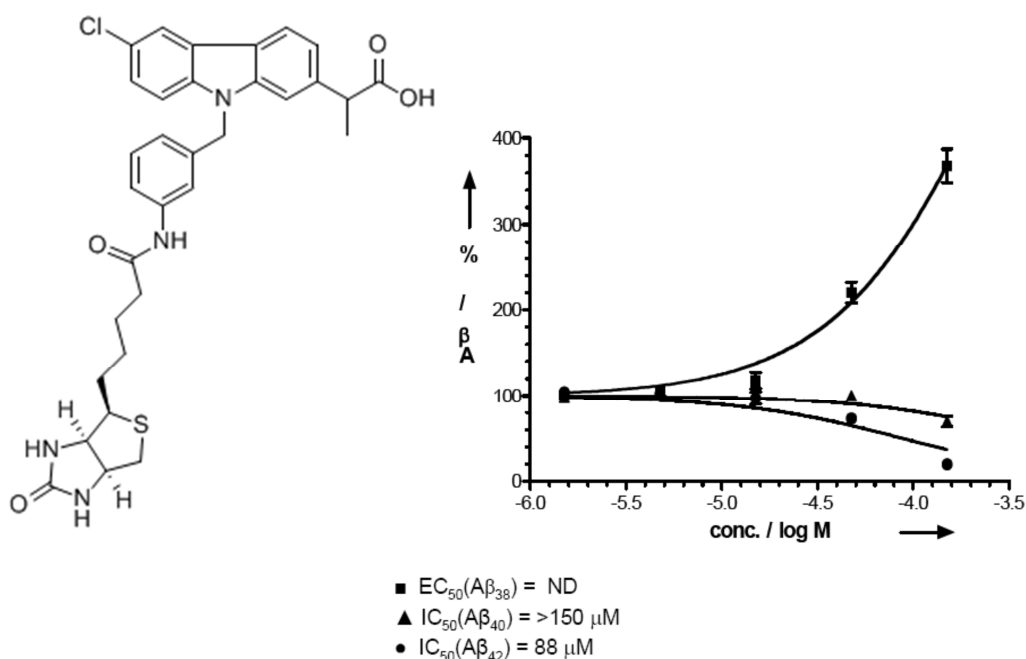


Abb. 37: Biotinyliertes Carprofen **61** (**BSc2911**) und seine Aβ-Modulation.

Derartige Aktivitäten sind in der Regel zu schwach für erfolgreiche Immunoprecipitationsexperimente. Deshalb wird eine photoaktivierbare, irreversible Markierung des Interaktionspartners notwendig. Unter Berücksichtigung der bislang erarbeiteten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wird deshalb ein photoreaktives Azid in der unmittelbaren Umgebung der essentiellen Carbonsäure als aussichtsreichstes Markierungsderivat eingeführt (Abb. 38).

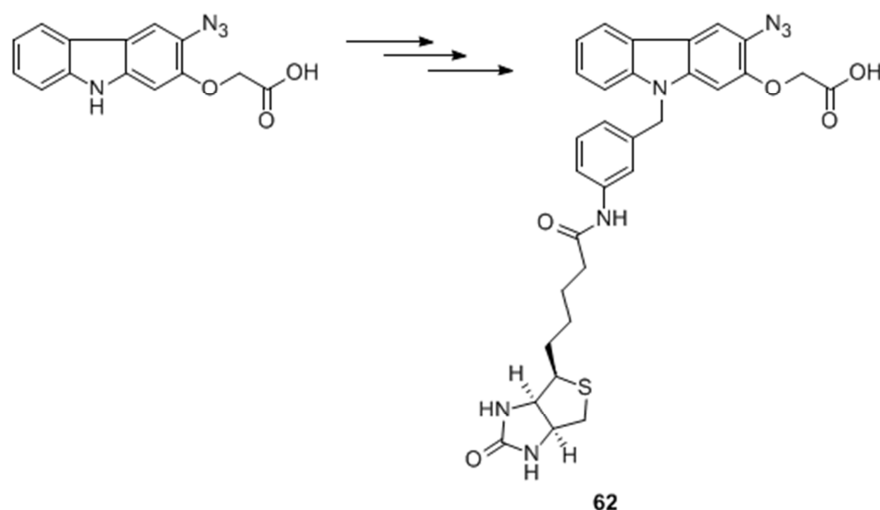


Abb. 38: Photoreaktives biotinyliertes Carbazol **62**.

In einer ersten Syntheseüberlegung sollte das photoreaktive biotinylierte Carbazol-Derivat **62**, in einer siebenstufigen Synthese ausgehend vom 2-Hydroxycarbazol (**63**) aufgebaut werden (Abb. 39). Zunächst sollte 2-Hydroxycarbazol (**63**) mit 2-Bromessigsäuremethylester zu Produkt **64** umgesetzt und anschließend in Position 3 zum Carbazol **65** nitriert werden. Nach nukleophiler Substitution zu Carbazol **66**, sollte die Kupplung mit Biotin zu Produkt **67** erfolgen. Die anschließende Reduktion der Nitrogruppe zu Amin **68**, dessen weitere Umsetzung zu Azid **69** und die basische Hydrolyse des Esters sollten Carbazol **62** liefern.

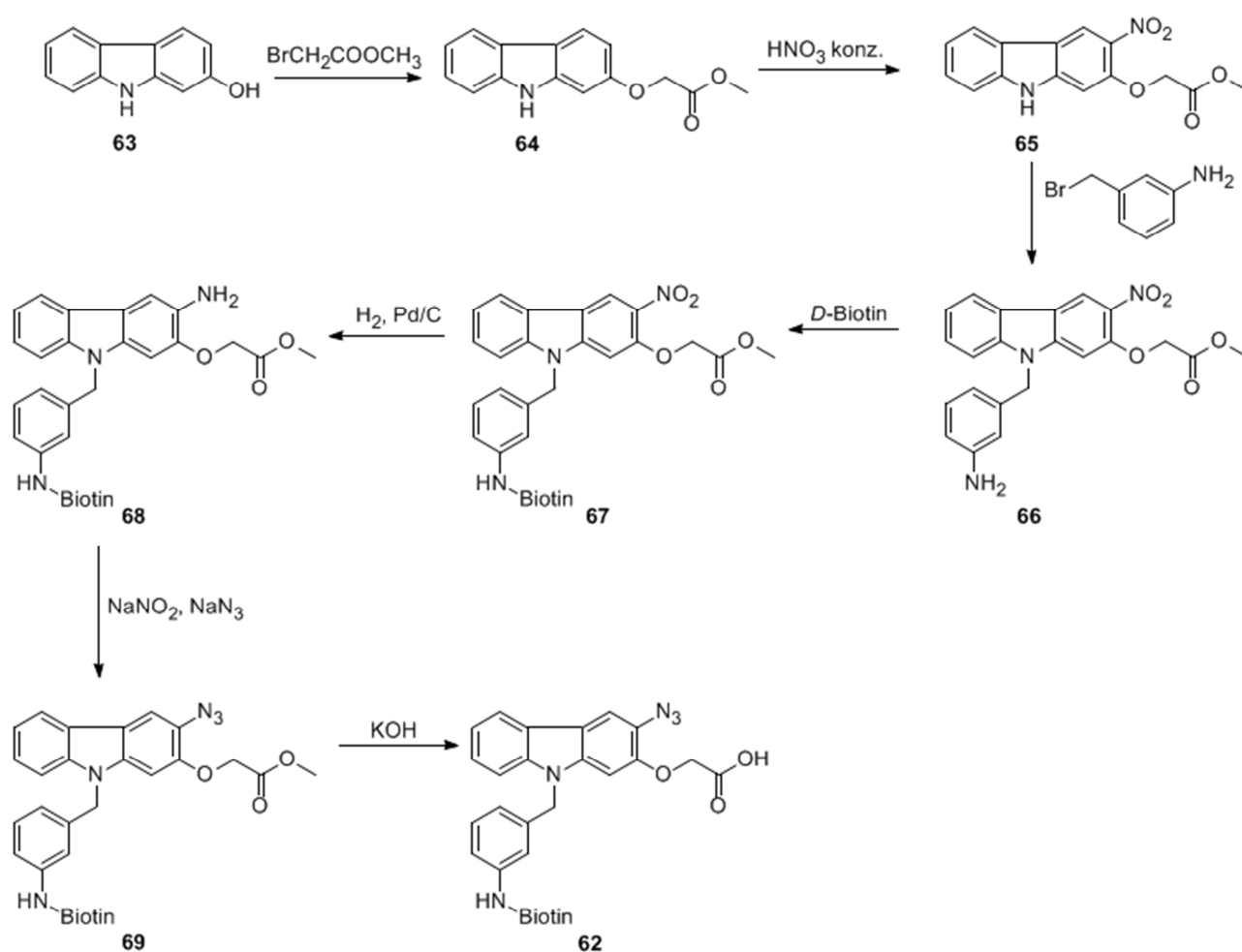


Abb. 39: Allgemeines Reaktionsschema des photoreaktiven biotinylierten Carbazol **62**.

Die Schwierigkeit, die sich bei der geplanten Syntheseroute ergab, lag bei der Einführung der Nitrogruppe in Position 3 des Carbazols **65** und ist in Abb. 40 schematisch dargestellt. Es war nicht möglich, die Nitrogruppe selektiv in Position 3 einzuführen, stattdessen führte die Reaktion zum zweifachsubstituierten Nitrocarbazol **70**. Auch der Einsatz von Schutzgruppen (Benzyl-, Silyl-, Acetylgruppen), um Position 1 für die anschließende Nitrierung sterisch zu hindern, führe nicht zum

Erfolg. Auch hier wurde das zweifachsubstituierte Nitrocarbazol **71** isoliert, sodass die Syntheseroute verworfen werden musste (Abb. 40).

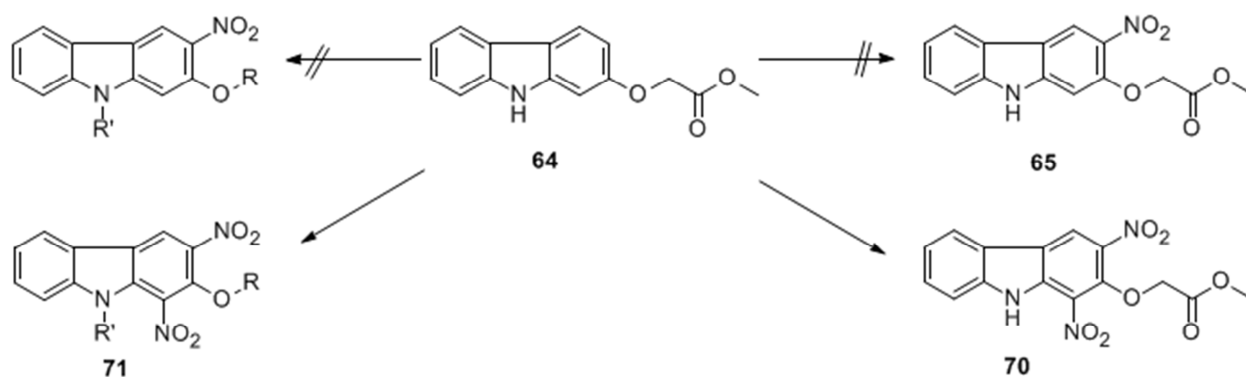
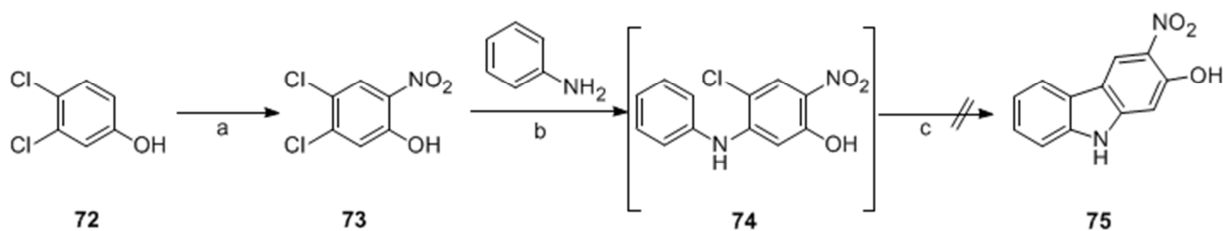


Abb. 40: Versuch der selektiven Nitrierung von Carbazol **65**.

Um das Problem der Mehrfachnitrierung zu umgehen, wurde im folgenden Synthesepplan entschieden, das nitrierte Carbazol **75** aus den einzelnen Synthesebausteinen aufzubauen. Dabei sollte das substituierte Carbazol **75** in einer Eintopfreaktion über eine palladiumkatalysierte Arylaminierung gefolgt von einer intramolekularen Arylierung aufgebaut werden (Abb. 41). Dazu wurde das kommerziell erhältliche 3,4-Dichlorphenol (**72**) in Position 6 zu **73** nitriert. Die anschließende palladiumkatalysierte Dominoreaktion in Anlehnung an Ackermann et al.^[176] führte jedoch nur zu dem Zwischenprodukt **74**. Auch die Variation der Reaktionsbedingungen sowie der Liganden, Basen und Lösungsmittel (Abb. 41) führte nicht zum gewünschten Produkt **75**, sondern zu dem Aminierungsprodukt **74**. Die Isolierung des Kupplungsproduktes **74** und die weitere Umsetzung zu dem Hydroxycarbazol **75** führten auch nicht zum Erfolg. Da in der Literatur bis dato keine palladiumkatalysierte Dominoreaktionen zu Carbazolen, die eine Nitrogruppe enthalten beschrieben wurden, liegt die Vermutung nahe, dass die Nitrogruppe durch den relativ starken elektronenziehenden Effekt auf den Aromaten die direkte Arylierung erschwert.



Nr.	Ligand	Base	Lösungsmittel	Temp. (°C), Zeit (h)
1	PCy ₃	K ₃ PO ₄	NMP	130, 18
2	PCy ₃ ·HBF ₄	K ₃ PO ₄	NMP	130, 18
3	PCy ₃	NaOtBu	Toluol	105, 18
4	PPh ₃	K ₃ PO ₄	NMP	130, 18
5	PPh ₃	NaOtBu	Toluol	105, 18
6	PPh ₃	NaOtBu	<i>o</i> -Xylol	145, 40
7	[HP ^t Bu ₃][BF ₄]	KOtBu	Toluol	111, 18

Abb. 41: Synthese von Carbazol **75**. Reagenzien und Bedingungen: (a) HNO₃ (konz.), AcOH, 0°C – RT, 1 h, 55%, (b) und (c) siehe Tabelle.

Die dritte entwickelte Synthesestrategie bestand darin, das Carbazol **65** über eine oxidative Kupplung des Aminierungsproduktes aufzubauen und die Synthese wie in Abb. 42 dargestellt durchzuführen. Dazu wurde zunächst 3-Bromphenol (**76**) in Position 6 zu 5-Brom-2-nitrophenol (**77**) nitriert, welches dann mit 2-Bromessigsäuremethylester und K₂CO₃ in Aceton zu Methylester **78** weiter umgesetzt wurde. Anschließend wurde das entstandene Produkt **78** in einer Buchwald-Hartwig Aminierung mit Anilin in Gegenwart von Pd(OAc)₂, BINAP, Cs₂CO₃ zu Produkt **79** umgesetzt. Die darauffolgende Pd(OAc)₂, Cu(OAc)₂ katalysierte oxidative Kupplung liefert in Anlehnung an Knölker et al.^[177] das gewünschte substituierte Carbazol **65**.

Das für die nukleophile Substitution benötigte 1-Azido-3-(bromomethyl)benzol (**86**) wurde wie in Abb. 43 dargestellt aufgebaut. Zunächst wurde *m*-Toluidin (**84**) unter Standardbedingungen zu dem Azid **85** in sehr guten Ausbeuten umgesetzt.^[178] Die Bromierung der Methylgruppe durch NBS und katalytischen Mengen AMPN in Benzol^[179] liefert das gewünschte Bromid **86** in 44%iger Ausbeute. Die nukleophile Substitution des Bromids **86** an das Carbazol **65** führt zum substituierten Carbazol **80**. Das für die Kupplung des (*D*)-Biotins benötigte Amin **81** wird in einer Staudinger Reaktion aus dem Azid **80** generiert.^[180] Die Kupplung des (*D*)-Biotins erfolgt in Gegenwart der Kupplungsreagenzien HOBt und EDAC und liefert das biotinylierte Nitrocarbazol **82** mit 84%iger Ausbeute. Anschließend wird das Azidocarbazol **83** in einer Eintopfreaktion erzeugt. Dazu wird zunächst die Nitrogruppe am Carbazol **82** mit H₂ und Pd/C zu dem entsprechenden Amin reduziert und dann *in situ* mit NaNO₂ in salzsaurer Lösung zum Diazoniumsalz umgesetzt. Nach NaN₃-Zugabe konnte nach Aufarbeitung das

Azidocarbazol **83** isoliert werden. Die anschließende basische Hydrolyse von Methylester **83** ergab das gewünschte photoreaktive biotinylierte Carbazol **62**.

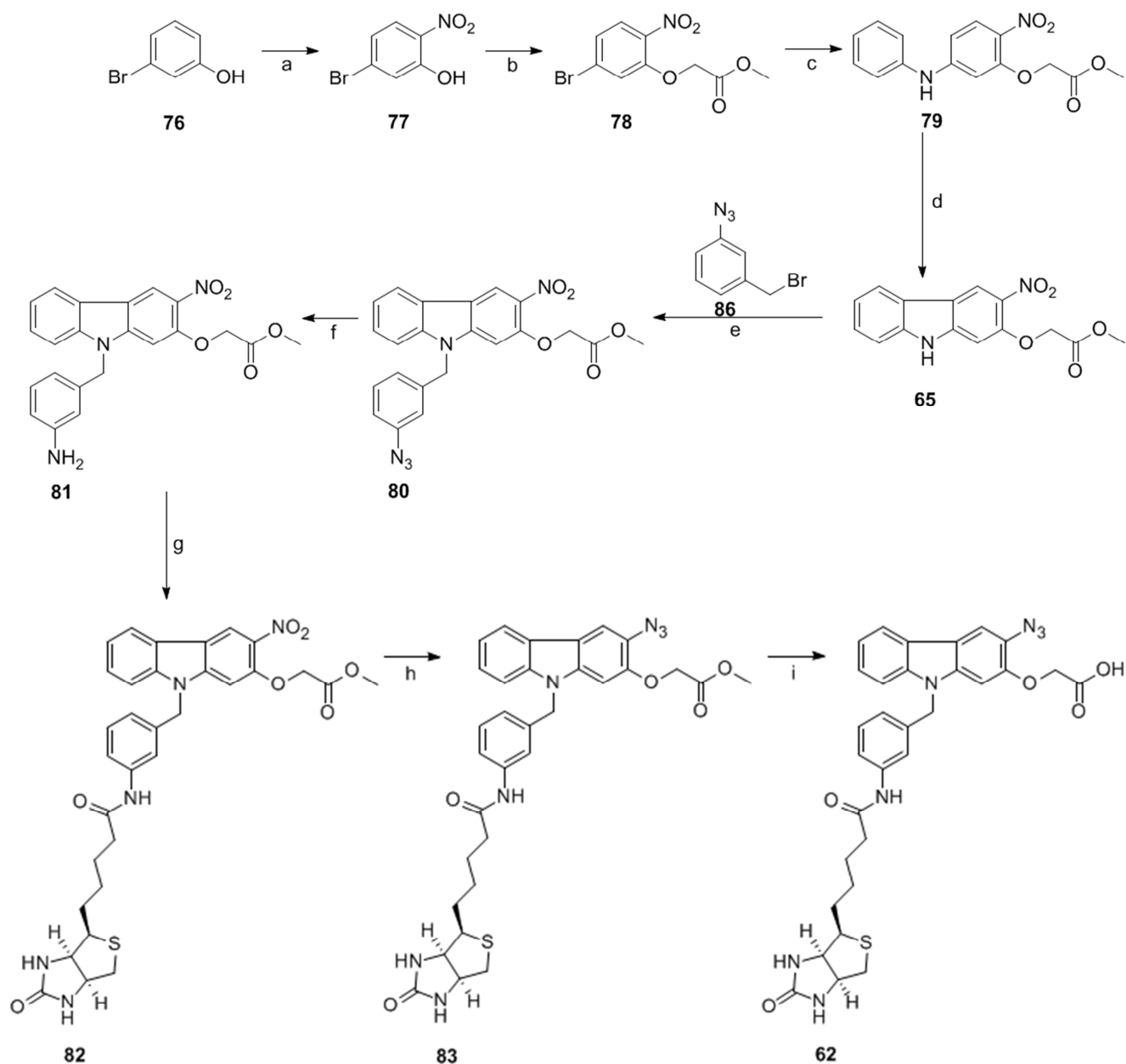


Abb. 42: Synthese des biotinylierten Carbazol **62**. Reagenzien und Bedingungen: (a) HNO_3 (konz.), AcOH, 0°C -RT, 1 h, 21%, (b) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$, K_2CO_3 , Aceton, 60°C , 4 h, 99%, (c) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, BINAP, Cs_2CO_3 , Toluol, 111°C , 4 h, 67%, (d) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, O_2 , AcOH, Toluol, 111°C , μv , 3 h, 72%, (e) Cs_2CO_3 , Argon, DMF, 0°C -RT, 2.5 h, 99%, (f) i.) PPh_3 , THF, RT, 12 h, ii.) H_2O , Rückfluss, 24 h, 70%, (g) (*D*)-Biotin, EDAC, HOBT, TEA, DMF, RT, 19 h, 84%, (h) iii.) H_2 , Pd/C, HCl (konz.), MeOH, 1.5 h, iv.) NaNO_2 , HCl konz., H_2O , 0°C , 1.5 h, v.) NaN_3 , H_2O , 0°C -RT, 15 h, 69%, (i) KOH, MeOH, Rückfluss, 6 h, 70%.

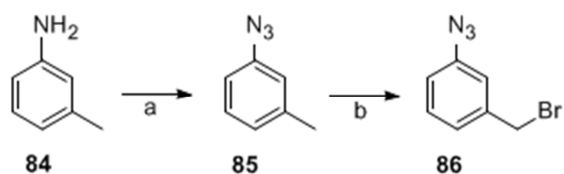


Abb. 43: Synthese von **86**. Reagenzien und Bedingungen: (a) i.) NaNO_2 , HCl konz., H_2O , 0°C , 3 h, ii.) NaN_3 , H_2O , 0°C -RT, 20 h, 99%, (b) NBS, AMPN, Benzol, Argon, Rückfluss, 5 h, 44%.

Die Aktivität des photoreaktiven biotinylierten Carbazol-Derivats **62** wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sascha Weggen bestimmt, und das Ergebnis ist in Abb. 44 dargestellt. Der modulierende Effekt ist erkennbar, tritt allerdings erst bei Konzentrationen von ca. $70\ \mu\text{M}$ auf.

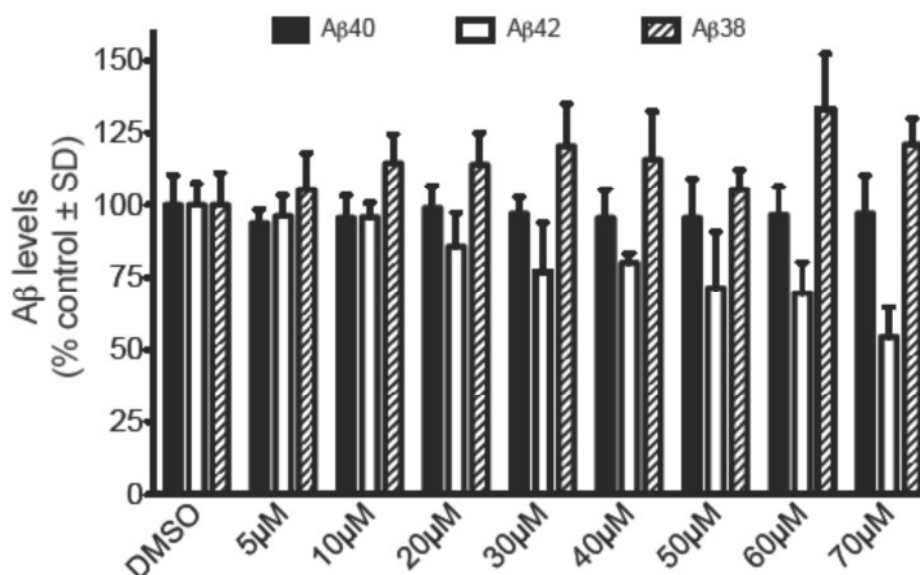


Abb. 44: Graphische Auswertung der Aβ-Hemmung von Verbindung **62** bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Mit der Synthese von **62** ist es gelungen, ein photoreaktives biotinyliertes Carbazolderivat als GSM aufzubauen. Jedoch sind weitere Studien notwendig, um einen im unteren mikromolaren Bereich aktiven Modulator zu entwickeln, der für Markierungsexperimente genutzt werden kann.

3.5 Oxidative Homologisierung von Aldehyden zu α -Ketoaldehyden unter Verwendung von Iodoform, *o*-Iodoxybenzoesäure und Dimethylsulfoxid

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits veröffentlicht:

Autoren: Andrea Zall, Dennis Bensinger, Boris Schmidt.

Titel: “*Oxidative Homologation of Aldehydes to α -Ketoaldehydes by using Iodoform *o*-Iodoxybenzoic Acid, and Dimethylsulfoxide*”.

Journal: European Journal of Organic Chemistry, **2012**, 1439-1447.

Zusammenfassung:

α -Ketoaldehyde sind vielseitig einsetzbare und hochreaktive Ausgangsverbindungen für die Synthese von heterocyclischen Verbindungen. Als peptidische α -Ketoaldehyde nehmen sie eine wichtige Rolle bei der Inhibition des 20S-Proteasoms ein. Verschiedene synthetische Ansätze zu peptidischen α -Ketoaldehyde wurden bisher publiziert, die jedoch ein gewisses Gefahrenpotential sowie zum Teil schlechte Ausbeuten beinhalten. Ausgehend von Arylaldehyden wurde eine effiziente 3-Stufen Synthese zu α -Ketoaldehyden entwickelt, die auf die Synthese von peptidischen α -Ketoaldehyde ausgeweitet werden konnte. Verschiedene Aldehyde wurden zunächst mit *i*PrMgCl und Iodoform zu den gewünschten β -Diiodoalkoholen umgesetzt, welche dann anschließend mit Iodoxybenzoesäure (IBX) bei RT zu den entsprechenden β -Diiodketonen oxidiert wurden. Die nachfolgende Umsetzung der Diiodketone zu α -Ketoaldehyden erfolgte durch Sauerstofftransfer mittels DMSO. Diese sensitiven Produkte wurden *in situ* mit *o*-Phenylendiamin zu den stabilen monosubstituierten Chinoxalinen cyclisiert, die leicht zu charakterisieren und isolieren waren. Die publizierte Synthese beschreibt zum ersten Mal die Umsetzung von β -Diiodketonen zu α -Ketoaldehyden mit DMSO als einziges Reagenz.

Die im Rahmen dieser Arbeit projektbezogenen hergestellten Verbindungen:

2a, 2b, 2c, 2e, 2f, 2h, 2j, 2k, 2l, 2m, 3a, 3b, 3c, 3e, 3f, 3h, 3i, 3j, 3k, 4a, 4b, 4c, 4e, 4f, 4h, 4i, 4j, 5a, 5b, 5c, 5e, 5f, 5h, 5i, 5j, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19.

Oxidative Homologation of Aldehydes to α -Ketoaldehydes by using Iodoform, *o*-Iodoxybenzoic Acid, and Dimethyl Sulfoxide

Andrea Zall,^[a] Dennis Bensinger,^[a] and Boris Schmidt^{*[a]}

Keywords: Homologation / Aldehydes / Oxidation / Synthetic methods

An efficient three-step synthetic route to α -ketoaldehydes starting from aryl aldehydes is reported. The aldehydes were treated with *i*PrMgCl and iodoform to obtain β -diiodoalcohols, which were then oxidized with *o*-iodoxybenzoic acid at room temperature to the corresponding β -diiodoketones.

Subsequent reaction of the β -diiodoketone to the α -ketoaldehyde occurred under oxygen transfer from dimethyl sulfoxide. These sensitive products were in situ cyclized with *o*-phenylenediamine to form the stable monosubstituted quinoxalines, which could be characterized and isolated easily.

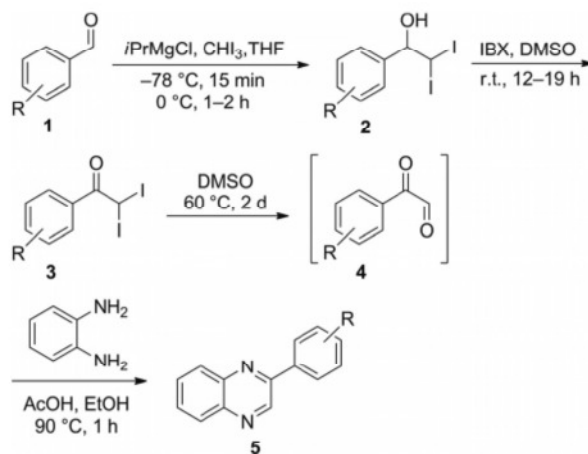
Introduction

α -Ketoaldehydes are a versatile, highly reactive moiety for the synthesis of heterocyclic compounds.^[1] Cyclization of α -ketoaldehydes has been utilized in the design of peptidyl α -ketoaldehydes, which inhibit the 20 S proteasome,^[2] and various synthetic approaches to such desirable peptidic α -ketoaldehydes have been established. A frequently employed method, the oxidation of α -diazoketones by using dimethyldioxirane (DMD), imposes a potential hazard in the scale up of the synthesis.^[3] Another versatile method, recently developed by Rademann et al., starts with the C-acylation of polymer-supported 2-phosphoranylidene acetates linked to protected amino acids, which is followed by saponification of the ester, decarboxylation, and oxidation with DMD.^[4]

The majority of the documented syntheses of α -ketoaldehydes rely on the oxidation of acetophenone by SeO₂.^[5] The alternative iodination of acetophenone under acidic conditions and subsequent oxidation of the phenacyl iodides with dimethyl sulfoxide has distinct merits.^[6] However, all these methods are unfavorable with respect to reagent toxicity, or require harsh reaction conditions or suffer from insufficient yields. An alternative approach to non-peptidic aldehydes utilizes dihalide compounds and dimethyl sulfoxide under mild conditions.^[7] Motivated by this method, we investigated the transformation of aldehydes into α -ketoaldehydes via β -diiodoketone intermediates and finally applied the procedure to the synthesis of peptidic substrates.

Results and Discussion

Here we report the efficient three-step synthetic route to α -ketoaldehydes starting from aryl aldehydes. Initially, the aldehydes were treated with *i*PrMgCl and iodoform to obtain desired β -diiodoalcohols **2**, which were then oxidized with *o*-iodoxybenzoic acid (IBX) at room temperature to the corresponding β -diiodoketones **3**. Compounds **3** are a valuable reactive species on their own. Subsequent reaction of β -diiodoketones **3** with α -ketoaldehydes **4** occurred under oxygen transfer from dimethyl sulfoxide. These sensitive products were then cyclized in situ with *o*-phenylenediamine to form stable monosubstituted quinoxalines **5**, which could be characterized and isolated easily (Scheme 1).



Scheme 1. Synthesis route to α -ketoaldehydes/quinoxalines.

The synthesis of β -diiodoalcohols from simple aromatic aldehydes was described by Braun et al.^[8] and was extended to substituted benzaldehydes. A diverse array of commercial, substituted benzaldehydes **1** was subjected to the reaction conditions, and the corresponding products were iso-

[a] Technische Universität Darmstadt, Clemens Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Petersenstr. 22; 64287 Darmstadt, Germany
Fax: +49-6151-163278
E-mail: schmidt_boris@t-online.de

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201101835>.

Table 1. Scope of the reaction.^[a]

Entry	Substrate	Product	Yield [%] ^[b]
1			79
2			96
3			73
4			67
5			99
6			82
7			71
8			73
9			no product
10			no reaction

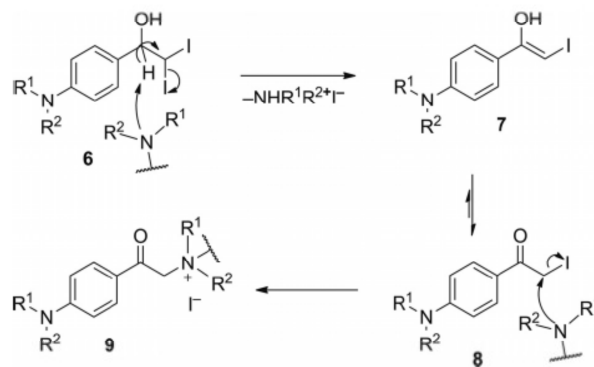
Table 1. (Continued)

Entry	Substrate	Product	Yield [%] ^[b]
11			76
12			76
13			94
14			67

[a] Reagents and conditions: **1** (1.0 mmol), *i*PrMgCl (2 M in THF, 3.0 mmol), CHI₃ (3.0 mmol) in THF at –78 °C for 15 min, then at 0 °C for 1–2 h. [b] Yield of isolated product.

lated in moderate to good yields with excellent functional group tolerance (Table 1, Entries 1–8, 11–14). The formation of the β-diiodoalcohols was achieved in a single step from the aldehyde and avoids expensive or sensitive reagents such as diazomethane and SmI₂.^[5a]

In general, it was observed that aldehydes containing either electron-withdrawing or electron-donating groups reacted smoothly to give the corresponding β-diiodoalcohols in good yields. These transformations occurred readily when the benzaldehyde was substituted in the *ortho*, *meta*, and *para* positions with a variety of substituents including methoxy, alkoxy, alkyl, hydroxy, and nitro groups (compounds **2b**, **2c**, **2g**, **2h**, **2m**, **2n**; Table 1). However, the reaction of aldehyde **1i** did not provide the desired product

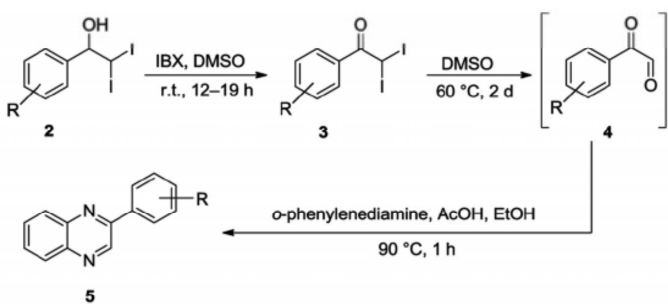


Scheme 2. Reaction of amines with β-diiodoalcohols.

upon workup. Desired product **2i** formed in the course of the reaction as monitored by HPLC–MS, but disintegrated during removal of the solvent to leave a complex product

mixture. A reason for the decomposition may be the strong nucleophilicity and basicity of tertiary amines, producing conjugated enol **7** by deprotection at C α and elimination of

Table 2. Scope of the reaction.^[a, b]



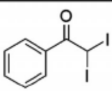
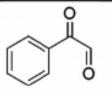
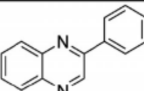
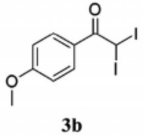
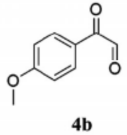
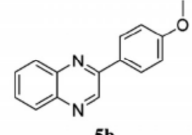
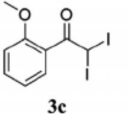
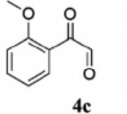
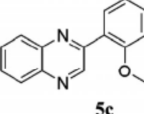
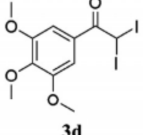
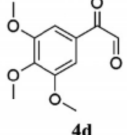
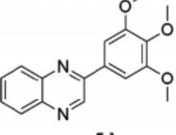
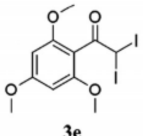
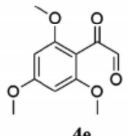
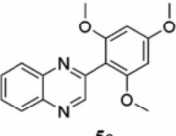
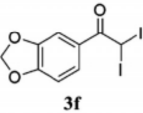
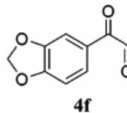
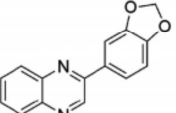
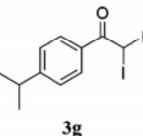
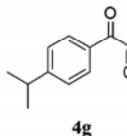
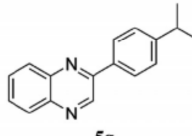
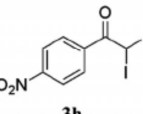
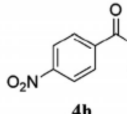
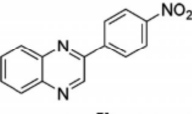
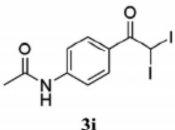
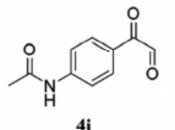
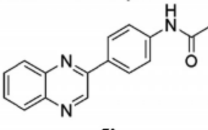
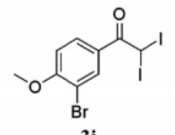
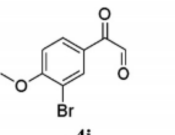
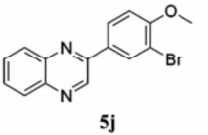
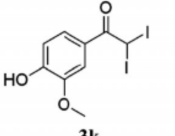
β -Diiodoketone	Yield [%] ^[c]	α -Ketoaldehyde ^[d]	Quinoxaline	Yield [%] ^[c]
 3a	82	 4a	 5a	81
 3b	93	 4b	 5b	84
 3c	64	 4c	 5c	88
 3d	71	 4d	 5d	81
 3e	88	 4e	 5e	84
 3f	84	 4f	 5f	90
 3g	56	 4g	 5g	81
 3h	not isolated	 4h	 5h	93

Table 2. (Continued)

β -Diiodoketone	Yield [%] ^[c]	α -Ketoaldehyde ^[d]	Quinoxaline	Yield [%] ^[c]
 3i	not isolated	 4i	 5i	83
 3j	94	 4j	 5j	90
 3k	reaction mixture			

[a] Reagents and conditions: **2** (1.0 mmol), IBX (2.0 mmol) in DMSO at room temperature for 12–19 h. [b] Compound **3** (1.0 mmol) in DMSO at 60 °C for 2 d, then AcOH, *o*-phenylenediamine (1.0 mmol) in EtOH at 90 °C for 1 h. [c] Yield of isolated product. [d] Detected by HPLC; in situ cyclization with *o*-phenylenediamine.

iodide. Enol **7** is in tautomeric equilibrium with β -diiodoketone **8**, which generates stable quaternary ammonium salt **9** by nucleophilic substitution (Scheme 2).

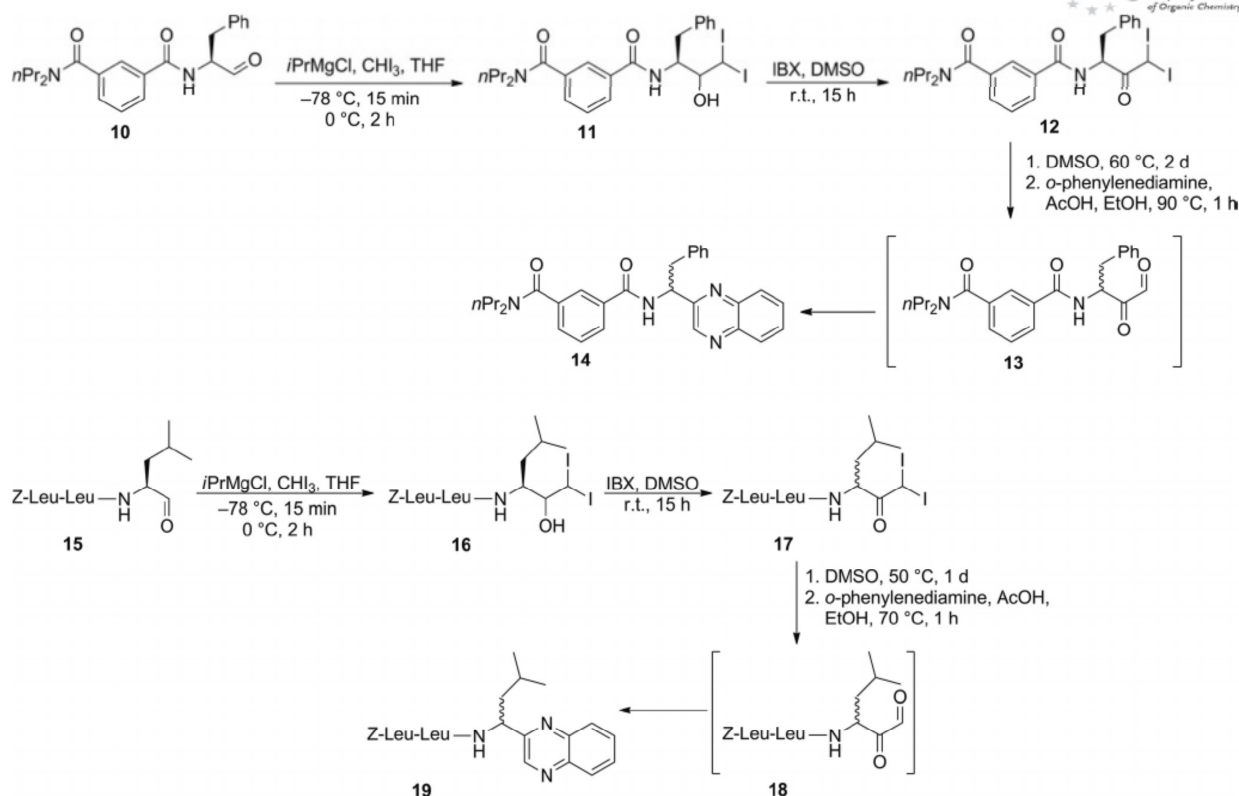
Phenolic precursor **1j** did not participate in the reaction and was recovered upon workup of the reaction mixture. Reduced acidity and nucleophilicity, which is realized in imidazole **1k** and amide **1l**, result in good to excellent yield, which supports the proposed hypothesis, illustrated in Scheme 2.

Subsequent oxidation of β -diiodoalcohols with 2-iodoxybenzoic acid (IBX)^[9] delivered the desired β -diiodoketones (Table 2). IBX is a selective and mild oxidizing agent for primary and secondary alcohols and has been applied to the oxidation of peptidic substrates previously.^[10]

The β -diiodoalcohols were oxidized with IBX (2 equiv.) in DMSO at room temperature within 12–19 h. Most β -diiodoalcohols reacted smoothly irrespective of the electronic nature of the groups in the *ortho*, *meta*, and *para* positions or multiple substitutions to provide the β -diiodoketones in good yields (56–94%, **3b–g**, **3j**; Table 2) except for *p*-phenol **2n**. This substrate was consumed rapidly as monitored by HPLC–MS, but gave a complex reaction mixture. This observation was rationalized by the ability to give a cyclohexadienone intermediate and the known IBX-mediated demethylation of 2-methoxyphenol.^[11] The oxidation of alcohols **2h** and **2l** proceeded so fast that resulting ketones **3h** and **3i** could not be isolated because they immediately reacted further to the corresponding α -ketoaldehydes **4h** and **4i**. These were then cyclized with *o*-phenylenediamine in situ to provide quinoxalines **5h** and **5i** as the final products. Isolated β -diiodoketones **3a–g** and **3j** were converted into desired α -ketoaldehydes **4** by DMSO at 60 °C. The reaction progress was monitored by HPLC until complete. The targeted, labile α -ketoaldehydes form hydrates and ketals easily and thus give rise to errors in yield

determination. Thus, in a one-pot reaction the α -ketoaldehydes were treated with *o*-phenylenediamine to give stable quinoxalines **5**, which facilitate yield comparison (Table 2). The transformation of *gem*-dihalomethylarenes into aldehydes by dimethyl sulfoxide as an oxygen donor was described to occur under neutral conditions for bromine and chlorine derivatives.^[7] Wei Li et al. proposed that the conversion proceeds via an alkoxysulfonium species, which undergoes 1,2-elimination to give the desired product and a halodimethylsulfonium halide as a byproduct. Therefore, we assumed that the reaction of the α -diiodoketones to afford the corresponding α -ketoaldehydes involved such an oxygen transfer from DMSO. This reaction mechanism was confirmed for substrate **3a** by NMR spectroscopy in [D₆]-DMSO. The ¹H NMR spectrum included a significant signal of the resulting aldehyde at $\delta \approx 9.55$ ppm and the ¹³C NMR spectrum showed signals at $\delta \approx 196$ and 189 ppm, typical for carbonyl groups of ketoaldehydes. The ¹³C NMR signal of the diiodinated carbon atom at $\delta \approx -22.4$ ppm disappeared at the same speed as the new signals arose.

We tested the potential and general applicability of this method by synthesizing peptidic and peptidomimetic α -ketoaldehydes **13** and **18**, which are versatile intermediates and may be used in protease inhibition (Scheme 3). Peptide aldehydes **10** and **15** were converted into peptidyl β -diiodoalcohols **11** and **16** in analogy to the aryl aldehydes, and this process was reported to occur without epimerization of the α -carbon.^[8] Subsequent oxidation by IBX provided peptidyl β -diiodoketones **12** and **17**. Reaction to peptidyl α -ketoaldehydes **13** and **18** was carried out in DMSO at 50 °C and was monitored by HPLC–MS. A structurally related analogue of ketoaldehyde **18** was identified recently as a potent inhibitor of the 20 S proteasome with a novel mode of action.^[2] Cyclocondensation with *o*-phenylenediamine at



Scheme 3. Synthesis route to peptidyl quinoxalines.

70 °C afforded peptidyl quinoxalines **14** and **19** in good yields. Compound **19** was isolated as a single diastereomer with >95% *dr* as assigned by ^1H NMR spectroscopic analysis of the quinolyl 3H, which gave one signal only (see spectrum 19 in the Supporting Information).

Conclusions

In summary, we have developed a simple and mild synthetic method to transform aldehydes into the corresponding α -ketoaldehydes via β -diiodoketones. This is the first example involving the use of DMSO as a single reagent/solvent to convert β -diiodoketones into α -ketoaldehydes. The synthetic route was applied to the straightforward synthesis of peptidyl α -ketoaldehydes from peptidic β -diiodoketones, which are versatile intermediates that can lead to structures for protease inhibition.

Experimental Section

General Methods: ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker AC 300 (300 MHz) and AC 500 (500 MHz) spectrometer. Chemical shifts are reported in δ (ppm) adjusted to the central line of the deuterated solvent (MeOD, CDCl_3 , $[\text{D}_6]\text{DMSO}$). Mass spectrometry was performed with a Bruker-Franzen Esquire LC mass spectrometer (ESI) and a double-focused MAT 95 (EI). HPLC analysis was performed with an Agilent 1100 system. The purity of the final compounds was determined by using UV detec-

tion ($\lambda = 254$ nm). The chromatographic method employed the following: column Zorbax Eclipse XDB-C18; 4.6×150 mm; mobile phase A H_2O (0.1% TFA), mobile phase B acetonitrile, flow rate 1 mL/min, gradient elution 30 to 100% B over 15 min. According to these methods the purities for all compounds were $\geq 95\%$ if not indicated otherwise in the experimental details. Thin-layer chromatography (TLC) was carried out by using aluminum sheets precoated with silica gel 60 F254 (0.2 mm; E. Merck). Chromatographic spots were visualized by UV and/or by spraying with a methanolic solution of vanillin/ H_2SO_4 or aq. KMnO_4 solution followed by heating. Silica gel chromatography was carried out by using Merck silica gel 60 (0.063–0.2 mm). Melting points were determined with a Mettler FP 51 melting point apparatus. All reagents and solvents (THF, DMF, CH_2Cl_2 , ethyl acetate, MeOH, DMSO) were purchased from ABCR, Acros and Alfa Aesar, TCI, Sigma Aldrich, and VWR.

Typical Procedure (TP I) for the Synthesis of β -Diiodoalcohols from Aldehydes: $i\text{PrMgCl}$ (2.0 M in THF, 1.5 mL, 3.0 mmol) was added dropwise to a solution of iodoform (1.18 g, 3.0 mmol) in THF (10 mL, abs.) at -78 °C under an argon atmosphere. A solution of aldehyde **1** (1.00 mmol) in THF (1 mL, abs.) was added, and the resulting mixture was stirred at the same temperature for 15 min and at 0 °C for 1–2 h. The mixture was quenched with aqueous NH_4Cl (10 mL, sat.) and extracted with CH_2Cl_2 (3×20 mL). The combined organic layers were dried with Na_2SO_4 and concentrated in vacuo. Crude product **2** was purified by LC.

Typical Procedure (TP II) for the Oxidation of β -Diiodoalcohols with IBX: To a solution of β -diiodoalcohol **2** (1.0 mmol) in DMSO (5 mL) was added IBX (0.56 g, 2.0 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 19 h. The reaction mixture was

quenched with water (50 mL) and CH_2Cl_2 (70 mL) was added. The precipitate was filtered off, and the organic layer was extracted with water (2×50 mL), washed with NaHCO_3 (50 mL, sat.), dried with Na_2SO_4 , and concentrated in vacuo. Crude product 3 was purified by LC.

Typical Procedure (TP III): Synthesis of Quinoxalines from β -Diiodoketones over α -Ketoaldehydes: β -Diiodoketone 3 (0.25 mmol) was dissolved in DMSO (2.5 mL) and stirred at 60 °C for 40 h (HPLC control). Glacial acetic acid (0.6 mL) and a solution of *o*-phenylenediamine (27 mg, 0.25 mmol) in EtOH (1.5 mL) was added to the reaction mixture, which was stirred at 90 °C for 1 h. After cooling, water (10 mL) was added, and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (2×15 mL). The combined organic layer was washed with water (2×30 mL), dried with Na_2SO_4 , and concentrated in vacuo. Crude product 5 was purified by LC.

2-Iodoxybenzoic Acid: 2-Iodobenzoic acid (4.0 g, 16.13 mmol) was added all at once to a solution of oxone (12.9 g, 20.97 mmol) in water (52 mL). The reaction mixture was warmed slowly to 73 °C and stirred at this temperature for 3 h. The suspension was then cooled to 5 °C and left at this temperature for 1.5 h with slow stirring. The mixture was filtered, and the solid was repeatedly rinsed with water (3×15 mL) and acetone (20 mL). The white, crystalline solid (4.26 g, 94%) was dried under reduced pressure. ^1H NMR (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 8.01 (m), 8.42 (s) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 167.5, 146.6, 133.3, 132.9, 131.4, 130.1, 125.0 ppm.

2,2-Diiodo-1-phenylethanol (2a): According to typical procedure TP I, benzaldehyde (1a; 0.30 g, 2.83 mmol), CHI_3 (3.34 g, 8.48 mmol), and *i*PrMgCl (4.2 mL, 8.48 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 834 mg (79%) of 2a as a brown oil. R_f (CHCl_3) = 0.67. HPLC: t_R = 6.52 min (97%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.44–7.36 (m, 5 H), 5.35 (d, J = 3.6, 2.0 Hz, 1 H), 4.71 (t, J = 3.9 Hz, 1 H), 2.85 (d, J = 3.8 Hz, 1 H, -OH) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 139.1, 128.8, 128.6, 126.5, 79.7, -10.8 ppm. MS (EI): m/z = 374 $[\text{M}]^+$.

2,2-Diiodo-1-(4-methoxyphenyl)ethanol (2b): According to typical procedure TP I, anisaldehyde (1b; 0.272 g, 2.0 mmol), CHI_3 (2.36 g, 6.0 mmol), and *i*PrMgCl (3.0 mL, 6.0 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 775 mg (96%) of 2b as a brown oil. R_f (CHCl_3) = 0.59. HPLC: t_R = 6.42 min (98%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.36–7.32 (m, 2 H), 6.81 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 5.28 (d, J = 4.7 Hz, 1 H), 4.65 (d, J = 4.4 Hz, 1 H), 3.82 (s, 3 H), 2.88 (s, 1 H, -OH) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 159.8, 131.2, 127.8, 113.9, 79.3, 55.3, -9.5 ppm. MS (EI): m/z = 404 $[\text{M}]^+$.

2,2-Diiodo-1-(2-methoxyphenyl)ethanol (2c): According to typical procedure TP I, *o*-methoxybenzaldehyde (1c; 0.30 g, 2.2 mmol), CHI_3 (2.60 g, 6.6 mmol), and *i*PrMgCl (3.3 mL, 6.6 mmol). The crude product was purified by LC (CH/CHCl_3 , 1:1). Yield: 654 mg (73%) of 2c as a brown oil. R_f (CH/CHCl_3 , 1:1) = 0.55. HPLC: t_R = 6.982 min (81%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.52–7.49 (m, 1 H), 7.39–7.33 (m, 1 H), 7.01 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 1 H), 6.88 (dd, J = 8.3, 0.9 Hz, 1 H), 5.66 (d, J = 3.8 Hz, 1 H), 4.51 (d, J = 3.6 Hz, 1 H), 3.88 (s, 3 H), 4.04 (s, OH) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 156.0, 129.6, 128.6, 127.5, 120.7, 110.5, 76.3, 55.5, -11.0 ppm. MS (EI): m/z = 404 $[\text{M}]^+$.

2,2-Diiodo-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethanol (2d): According to typical procedure TP I, 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde (1d; 0.35 g, 1.78 mmol), CHI_3 (2.1 g, 5.34 mmol), and *i*PrMgCl (2.7 mL, 5.4 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 550 mg (67%) of 2d as a brown-orange oil. R_f (CHCl_3) = 0.14.

HPLC: t_R = 5.90 min (99%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.63 (s, 2 H), 5.30 (d, J = 4.4 Hz, 1 H), 4.62 (t, J = 4.1 Hz, 1 H), 3.88 (s, 6 H), 3.85 (s, 3 H), 2.95 (d, J = 4.0 Hz, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 153.3, 138.2, 134.5, 103.8, 79.7, 60.8, 56.3, -11.2 ppm. MS (EI): m/z = 464 $[\text{M}]^+$.

2,2-Diiodo-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)ethanol (2e): According to typical procedure TP I, 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde (1e; 0.30 g, 1.53 mmol), CHI_3 (1.8 g, 4.59 mmol), and *i*PrMgCl (2.3 mL, 4.59 mmol). Yield: 700 mg (99%) of 2e as a brown solid. R_f (CHCl_3) = 0.50. HPLC: t_R = 7.20 min (93%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.06 (s, 2 H), 5.46 (d, J = 7.8 Hz, 1 H), 5.19 (t, J = 8.4 Hz, 1 H), 4.83 (s, 1 H), 3.79 (s, 6 H), 3.75 (s, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 161.4, 158.7, 107.2, 91.1, 75.0, 55.9, 55.4, -11.2 ppm. MS (EI): m/z = 464 $[\text{M}]^+$.

1-(Benzol[d][1,3]dioxol-5-yl)-2,2-diiodoethanol (2f): According to typical procedure TP I, piperonal (1f; 0.30 g, 2.0 mmol), CHI_3 (2.36 g, 5.99 mmol), and *i*PrMgCl (3.0 mL, 5.99 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 683 mg (82%) of 2f as a brown oil. R_f (CHCl_3) = 0.71. HPLC: t_R = 6.53 min (97%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.27–6.86 (m, 2 H), 6.79 (d, J = 8 Hz, 1 H), 5.99 (m, 2 H), 5.25 (d, J = 4.7 Hz, 1 H), 4.61 (d, J = 4.6 Hz, 1 H), 2.89 (s, -OH) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 147.8, 133, 120.5, 108.2, 106.9, 101.3, 79.4, -10.3 ppm. MS (EI): m/z = 418 $[\text{M}]^+$.

2,2-Diiodo-1-(4-isopropylphenyl)ethanol (2g): According to typical procedure TP I, 4-isopropylbenzaldehyde (1g; 0.30 g, 2.02 mmol), CHI_3 (2.39 g, 6.06 mmol), and *i*PrMgCl (3.0 mL, 6.06 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 590 mg (71%) of 2g as orange oil. R_f (CH/CHCl_3 , 1:1) = 0.21. HPLC: t_R = 7.91 min (90%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.35–7.22 (dd, J = 31.8, 8.2 Hz, 4 H), 5.33 (d, J = 4.6 Hz, 1 H), 4.69 (d, J = 4.5 Hz, 1 H), 2.92 (hept., J = 6.3 Hz, 1 H), 2.81 (s, 1 H, -OH), 1.26 (d, J = 6.9 Hz, 6 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 149.6, 136.4, 126.6, 126.5, 79.7, 33.9, 23.8, -10.4 ppm. MS (EI): m/z = 416 $[\text{M}]^+$.

2,2-Diiodo-1-(4-nitrophenyl)ethanol (2h): According to typical procedure TP I, 4-nitrobenzaldehyde (1h; 0.27 g, 1.79 mmol), CHI_3 (2.12 g, 5.38 mmol), and *i*PrMgCl (2.7 mL, 5.38 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 609 mg (73%) of 2h as a yellow solid. R_f (CHCl_3) = 0.42. HPLC: t_R = 6.76 min (95%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.18–8.14 (m, 2 H), 7.57–7.54 (m, 2 H), 5.28 (d, J = 4.1 Hz, 1 H), 4.76 (d, J = 4.1 Hz, 1 H), 2.96 (s, 1 H, -OH) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 147.9, 145.8, 127.7, 123.7, 78.6, -14.2 ppm. MS (EI): m/z = 419 $[\text{M}]^+$.

N-[4-(1-Hydroxy-2,2-diiodoethyl)phenyl]acetamide (2i): According to typical procedure TP I, 4-acetamidobenzaldehyde (1i; 0.30 g, 1.84 mmol), CHI_3 (2.17 g, 5.51 mmol), and *i*PrMgCl (2.8 mL, 5.51 mmol). The crude product was purified by LC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 20:1). Yield: 604 mg (76%) of 2i as a yellow solid. R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 20:1) = 0.28. HPLC: t_R = 4.262 min (98%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.15 (dd, J = 43.5, 8.6 Hz, 4 H), 5.03 (d, J = 4.4 Hz, 2 H), 4.3 (d, J = 4.4 Hz, 1 H), 4.25 (s, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 169.8, 137.9, 135.8, 126.7, 119.1, 78.3, 22.8, -12.3 ppm. MS (EI): m/z = 431 $[\text{M}]^+$.

1-(3-Bromo-4-methoxyphenyl)-2,2-diiodoethanol (2m): According to typical procedure TP I, 3-bromo-4-methoxybenzaldehyde (1m; 0.30 g, 1.40 mmol), CHI_3 (1.65 g, 4.19 mmol), and *i*PrMgCl (2.1 mL, 4.19 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 633 mg (94%) of 2m as a brown oil. R_f (CHCl_3) = 0.51. HPLC: t_R = 7.317 min (95%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.61 (d, J = 2.2 Hz, 1 H), 7.34 (ddd, J = 8.5, 2.2, 0.5 Hz, 1 H),

6.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H), 5.26 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H), 4.62 (d, $J = 4.2$ Hz, 1 H), 3.91 (s, 3 H), 2.89 (s, 1 H, -OH) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 156.1, 132.5, 131.5, 126.9, 117.8, 111.6, 78.6, 56.3, -10.7$ ppm. MS (EI): $m/z = 482$ [M] $^+$.

4-(1-Hydroxy-2,2-diiodoethyl)-2-methoxyphenol (2n): According to typical procedure TP I, 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (**1n**; 0.30 g, 1.97 mmol), CHI_3 (2.33 g, 5.91 mmol), and $i\text{PrMgCl}$ (3.0 mL, 6.0 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 555 mg (67%) of **2n** as a brown oil. R_f (CHCl_3) = 0.18. HPLC: $t_R = 4.89$ min (100%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.9$ (d, $J = 2$ Hz, 1 H), 6.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 6.79 (dd, $J = 8, 2$ Hz, 1 H), 5.6 (s, 1 H), 5.2 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H), 4.55 (t, $J = 4.0$ Hz, 1 H), 3.85 (s, 3 H), 2.76 (s, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 146.5, 145.9, 130.9, 119.9, 114.3, 109.0, 79.51, 56.1, -9.67$ ppm. MS (EI): $m/z = 420$ [M] $^+$.

2,2-Diiodo-1-phenylethanone (3a): According to typical procedure TP II, 2,2-diiodo-1-phenylethanol (**2a**; 0.57 g, 1.51 mmol) and IBX (0.85 g, 3.03 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 460 mg (82%) of **3a** as a brown oil. HPLC: $t_R = 7.486$ min (97%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.07$ – 8.00 (m, 2 H), 7.67–7.58 (m, 1 H), 7.53–7.44 (m, 2 H), 6.52 (s, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 188.3, 134.1, 129.5, 129.0, 128.7, -28.9$ ppm. MS (EI): $m/z = 372$ [M] $^+$.

2,2-Diiodo-1-(4-methoxyphenyl)ethanone (3b): According to typical procedure TP II, 2,2-diiodo-1-(4-methoxyphenyl)ethanol (**2b**; 0.19 g, 0.47 mmol) and IBX (0.26 g, 0.94 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 176 mg (93%) of **3b** as a brown solid. R_f (CHCl_3) = 0.65. HPLC: $t_R = 7.55$ min (97%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.95$ (d, $J = 9.1$ Hz, 2 H), 6.88 (d, $J = 9.1$ Hz, 2 H), 6.40 (s, 1 H), 3.82 (s, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 186.9, 164.3, 132.0, 121.0, 114.3, 55.6, -28.6$ ppm. MS (EI): $m/z = 402$ [M] $^+$. HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2\text{I}_2$ [M] $^+$ 401.8605; found 401.8612.

2,2-Diiodo-1-(2-methoxyphenyl)ethanone (3c): According to typical procedure TP II, 2,2-diiodo-1-(2-methoxyphenyl)ethanol (**2c**; 0.65 g, 1.62 mmol) and IBX (0.91 g, 3.24 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 415 mg (64%) of **3c** as a brown solid. HPLC: $t_R = 7.75$ min (98%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.86$ – 7.83 (m, 1 H), 7.52 (ddd, $J = 8.4, 7.3, 1.8$ Hz, 1 H), 7.07–6.99 (m, 2 H), 6.78 (s, 1 H), 3.96 (s, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 190.1, 158.1, 134.8, 132.9, 121.4, 119.9, 111.6, 56.0, -20.1$ ppm. MS (EI): $m/z = 402$ [M] $^+$. HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2\text{I}_2$ [M] $^+$ 401.8606; found 401.8612.

2,2-Diiodo-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethanone (3d): According to typical procedure TP II, 2,2-diiodo-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethanol (**2d**; 0.35 g, 0.75 mmol) and IBX (0.42 g, 1.51 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 250 mg (71%) of **3d** as a brown solid. R_f (CHCl_3) = 0.65. HPLC: $t_R = 7.41$ min (92%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.24$ (s, 2 H), 6.39 (s, 1 H), 3.88 (s, 3 H), 3.85 (s, 6 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 187.2, 153.1, 143.7, 123.3, 107.4, 61.1, 56.4, -29.7$ ppm. MS (EI): $m/z = 462$ [M] $^+$.

2,2-Diiodo-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)ethanone (3e): According to typical procedure TP II, 2,2-diiodo-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)ethanol (**2e**; 1.00 g, 2.15 mmol) and IBX (1.20 g, 4.40 mmol). The crude product was purified by LC ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 2:1). Yield: 813 mg (88%) of **3e** as a yellow solid. R_f ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) = 0.49. HPLC: $t_R = 7.49$ min (94%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.34$ (s, 1 H), 6.12 (s, 2 H), 3.85 (s, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 188.3, 163.9, 159.8, 104.3, 90.7, 56.0, 55.5, -17.8$ ppm. MS (EI): $m/z = 462$ [M] $^+$. HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{I}_2$ [M] $^+$ 461.8796; found 461.8823.

1-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2,2-diiodoethanone (3f): According to typical procedure TP II, 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2,2-diiodoethanol (**2f**; 0.62 g, 1.49 mmol) and IBX (0.84 g, 2.98 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 523 mg (84%) of **3f** as a brown solid. HPLC: $t_R = 7.51$ min (80%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.65$ (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1 H), 7.49 (d, $J = 1.8$ Hz, 1 H), 6.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H), 6.45 (s, 1 H), 6.08 (s, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 185.3, 151.3, 147.1, 124.5, 121.3, 107.9, 106.8, 100.8, -29.3$ ppm. MS (EI): $m/z = 416$ [M] $^+$. HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3\text{I}_2$ [M] $^+$ 415.8405; found 415.8404.

2,2-Diiodo-1-(4-isopropylphenyl)ethanone (3g): According to typical procedure TP II, 2,2-diiodo-1-(4-isopropylphenyl)ethanol (**2g**; 0.59 g, 1.27 mmol) and IBX (0.71 g, 2.54 mmol). Yield: 330 mg (56%) of **3g** as a brown oil. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CHCl}_3$, 1:1) = 0.56. HPLC: $t_R = 8.69$ min (61%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.89$ (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 7.25 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H), 6.43 (s, 1 H), 2.91 (hept., $J = 6.3$ Hz, 1 H), 1.20 (d, $J = 6.9$ Hz, 6 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 187.9, 156.0, 129.8, 127.2, 126.3, 34.4, 23.6, -28.5$ ppm. MS (EI): $m/z = 414$ [M] $^+$.

1-(3-Bromo-4-methoxyphenyl)-2,2-diiodoethanone (3j): According to typical procedure TP II, 1-(3-bromo-4-methoxyphenyl)-2,2-diiodoethanol (**2m**; 0.19 g, 0.39 mmol) and IBX (0.22 g, 0.79 mmol). Yield: 178 mg (94%) of **3j** as a brown oil. HPLC: $t_R = 8.28$ min (60%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.25$ (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H), 8.02 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1 H), 6.94 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H), 6.42 (s, 1 H), 3.99 (s, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 184.9, 159.0, 133.5, 129.9, 120.9, 111.5, 111.3, 55.5, -29.7$ ppm. MS (EI): $m/z = 480$ [M] $^+$.

2-Phenylquinoxaline (5a): According to typical procedure TP III, 2,2-diiodo-1-phenylethanone (**3a**; 66 mg, 0.18 mmol) and *o*-phenylenediamine (19 mg, 0.18 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 30 mg (81%) of **5a** as a white solid. R_f (CHCl_3) = 0.41. HPLC: $t_R = 6.67$ min (99%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.34$ (s, 1 H), 8.14–8.10 (m, 4 H), 7.82–7.72 (m, 2 H), 7.61–7.50 (m, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 151.9, 143.4, 142.3, 141.6, 136.8, 130.0, 130.2, 129.7, 129.6, 129.2, 127.6$ ppm.

2-(4-Methoxyphenyl)quinoxaline (5b): According to typical procedure TP III, 2,2-diiodo-1-(4-methoxyphenyl)ethanone (**3b**; 85 mg, 0.21 mmol) and *o*-phenylenediamine (23 mg, 0.21 mmol). The crude product was purified by LC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CHCl}_3$, 1:1). Yield: 42 mg (84%) of **5b** as a brown solid. R_f (Cy/CHCl_3 , 1:1) = 0.23. HPLC: $t_R = 6.81$ min (93%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.31$ (s, 1 H), 8.17 (m, 4 H), 7.76 (m, 2 H), 7.09 (m, 2 H), 3.91 (s, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 161.5, 151.5, 143.1, 142.3, 141.2, 133.9, 130.2, 129.4, 129.1, 114.6, 113.9, 55.4$ ppm. MS (EI): $m/z = 236$ [M] $^+$.

2-(2-Methoxyphenyl)quinoxaline (5c): According to typical procedure TP III, 2,2-diiodo-1-(2-methoxyphenyl)ethanone (**3c**; 100 mg, 0.25 mmol) and *o*-phenylenediamine (27 mg, 0.25 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl_3). Yield: 52 mg (88%) of **5c** as a yellow solid. HPLC: $t_R = 6.56$ min (99%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.36$ (s, 1 H), 8.05–8.04 (m, 2 H), 7.84–7.82 (dd, $J = 7.6, 1.8$ Hz, 2 H), 7.70–7.65 (m, 2 H), 7.42–7.39 (ddd, $J = 8.3, 7.4, 1.8$ Hz, 1 H), 7.10–7.00 (td, $J = 7.1, 1.0$ Hz, 1 H), 6.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 3.83 (s, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 157.4, 152.2, 147.3, 142.7, 141.0, 131.6, 131.4, 129.8, 129.6, 129.4, 129.1, 126.6, 121.6, 111.5, 55.7$ ppm. MS (EI): $m/z = 236$ [M] $^+$. HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ [M] $^+$ 236.0931; found 236.0950.

2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)quinoxaline (5d): According to typical procedure TP III, 2,2-diiodo-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethanone

(3d; 250 mg, 0.54 mmol) and *o*-phenylenediamine (59 mg, 0.54 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl₃/MeOH, 50:1). Yield: 130 mg (81%) of **5d** as a brown solid. *R*_f (CHCl₃/MeOH = 50:1) = 0.67. HPLC: *t*_R = 6.30 min (76%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 9.28 (s, 1 H), 8.14–8.10 (m, 2 H), 7.81–7.71 (m, 2 H), 7.43 (s, 2 H), 4.01 (s, 6 H), 3.94 (s, 3 H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 153.8, 151.4, 143.2, 142.2, 141.5, 140.2, 132.2, 130.3, 129.5, 129.1, 104.8, 61.0, 56.4 ppm. MS (EI): *m/z* = 296 [M]⁺.

2-(2,4,6-Trimethoxyphenyl)quinoxaline (5e): According to typical procedure TP III, 2,2-diiodo-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)ethanone (3e; 120 mg, 0.26 mmol) and *o*-phenylenediamine (28 mg, 0.26 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl₃). Yield: 65 mg (84%) of **5e** as a yellow solid. HPLC: *t* = 5.89 min (89%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.85 (s, 1 H), 8.30–8.08 (m, 2 H), 7.82–7.71 (m, 2 H), 6.27 (s, 2 H), 3.90 (s, 3 H), 3.76 (s, 6 H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 162.7, 159.5, 148.6, 140.8, 129.7, 129.4, 129.0, 91.0, 55.9, 55.5 ppm.

2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)quinoxaline (5f): According to typical procedure TP III, 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2,2-diiodoethanone (105 mg, 0.25 mmol) and *o*-phenylenediamine (27 mg, 0.25 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl₃). Yield: 57 mg (90%) of **5f** as a white solid. HPLC: *t*_R = 6.85 min (95%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 9.17 (s, 1 H), 8.03–8.00 (m, 2 H), 7.70–7.61 (m, 4 H), 6.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 5.99 (s, 3 H) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 150.2, 148.6, 147.7, 142.0, 141.2, 140.3, 130.1, 129.2, 128.4, 128.2, 128.0, 121.0, 107.8, 106.7, 100.6 ppm. MS (EI): *m/z* = 250 [M]⁺. HRMS (EI): calcd. for C₁₅H₁₀N₂O₂ [M]⁺ 250.0722; found 250.0742.

2-(4-isopropylphenyl)quinoxaline (5g): According to typical procedure TP III, 2,2-diiodo-1-(4-isopropylphenyl)ethanone (3g; 110 mg, 0.54 mmol) and *o*-phenylenediamine (58.5 mg, 0.54 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl₃/MeOH, 50:1). Yield: 130 mg (81%) of **5g** as a brown solid. *R*_f (CH/CHCl₃ 1:1) = 0.36. HPLC: *t* = 8.26 min (81%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 9.23 (s, 1 H), 8.07–8.01 (m, 4 H), 7.71–7.35 (m, 2 H), 7.35–7.31 (m, 2 H), 2.92 (hept., *J* = 6.3 Hz, 1 H), 1.23 (d, *J* = 6.9 Hz, 6 H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 151.9, 151.4, 143.4, 142.4, 141.4, 134.4, 131.5, 130.2, 129.6, 129.3, 129.1, 127.6, 127.3, 34.1, 23.9 ppm. MS (EI): *m/z* = 248 [M]⁺.

2-(4-Nitrophenyl)quinoxaline (5h): According to typical procedure TP II and TP III (one pot), 2,2-diiodo-1-(4-nitrophenyl)ethanol (2h; 100 mg, 0.24 mmol), IBX (134 mg, 0.48 mmol), and *o*-phenylenediamine (26.0 mg, 0.24 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl₃). Yield: 56 mg (93%) of **5h** as a brown solid. *R*_f (CHCl₃) = 0.66. HPLC: *t*_R = 7.19 min (90%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 9.40 (s, 1 H), 8.42 (s, 4 H), 8.14–8.08 (m, 2 H), 7.80–7.73 (m, 2 H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 149.3, 148.7, 142.8, 142.6, 142.2, 142.1, 130.9, 130.7, 129.9, 129.3, 128.4, 124.3 ppm. MS (EI): *m/z* = 251 [M]⁺. HRMS (EI): calcd. for C₁₄H₉N₃O₂ [M]⁺ 251.0685; found 251.0695.

***N*-[4-(Quinoxalin-2-yl)phenyl]acetamide (5i)**: According to typical procedure TP II and TP III (one pot), *N*-[4-(1-hydroxy-2,2-diiodoethyl)phenyl]acetamide (2i; 200 mg, 0.46 mmol), IBX (260 mg, 0.93 mmol), and *o*-phenylenediamine (50.0 mg, 0.47 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl₃/MeOH, 20:1). Yield: 102 mg (83%) of **5i** as a white solid. HPLC: *t*_R = 4.60 min (97%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 9.31 (s, 1 H), 8.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 8.16–8.08 (m, 2 H), 7.81–7.69 (m, 4 H), 7.39 (s, 1 H), 2.24 (s, 3 H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 168.4, 151.1, 143.0, 142.3, 141.4, 139.9, 132.4, 130.4, 129.5, 129.4, 129.1, 128.4, 120.0, 24.8 ppm. MS (EI): *m/z* = 263 [M]⁺.

2-(3-Bromo-4-methoxyphenyl)quinoxaline (5j): According to typical procedure TP III, 1-(3-bromo-4-methoxyphenyl)-2,2-diiodoethanone (3j; 95 mg, 0.20 mmol) and *o*-phenylenediamine (21.0 mg, 0.20 mmol). The crude product was purified by LC (CHCl₃). Yield: 56 mg (90%) of **5j** as a white solid. *R*_f (CHCl₃) = 0.455. HPLC: *t*_R = 7.84 min (99%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 9.26 (s, 1 H), 8.47 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H), 8.15–8.07 (m, 3 H), 7.82–7.68 (m, 2 H), 7.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H), 3.90 (s, 3 H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 157.6, 150.0, 142.6, 142.2, 141.4, 132.5, 130.5, 130.4, 129.4, 129.1, 127.7, 112.8, 112.0, 56.4 ppm. MS (EI): *m/z* = 314 [M]⁺. HRMS (EI): calcd. for C₁₅H₁₁N₂OBr [M]⁺ 314.00243; found 314.0055.

***N*¹-[2(S)-3-Hydroxy-4,4-diiodo-1-phenylbutan-2-yl]-*N*³,*N*³-dipropylisophthalamide (11)**: *i*PrMgCl (2.0 M in THF, 2.50 mL, 5.05 mmol) was added dropwise to a solution of iodoform (1988 mg, 5.05 mmol) in THF (25 mL, abs.) at –78 °C under an argon atmosphere. A solution of aldehyde **10** (358 mg, 1.01 mmol) in THF (5 mL, abs.) was added, and the resulting mixture was stirred at the same temperature for 15 min and at 0 °C for 2 h. The mixture was quenched with aqueous NH₄Cl (30 mL, sat.) and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 35 mL). The combined organic layer was dried with Na₂SO₄ and concentrated in vacuo. The crude product was purified by LC (CHCl₃) to give β-diiodoalcohol **11** (470 mg, 77%) as a yellow solid. *R*_f (CHCl₃) = 0.31. HPLC: *t*_R = 7.62 min (98%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.70 (td, *J* = 7.0, 1.9 Hz, 1 H), 7.62–7.61 (m, 1 H), 7.44–7.35 (m, 2 H), 7.28–7.18 (m, 5 H), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 5.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 4.87 (dq, *J* = 7.9, 2.2 Hz, 1 H), 3.72 (dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz, 1 H), 3.55–3.37 (m, 2 H), 3.12–3.06 (m, 2 H), 2.98–2.01 (m, 2 H), 1.68–1.49 (m, 4 H), 1.09–0.84 (m, 3 H), 0.83–0.59 (m, 3 H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 171.1, 167.5, 137.3, 137.2, 134.5, 129.5, 129.3, 128.8, 128.7, 128.2, 126.8, 125.1, 76.8, 52.8, 50.9, 46.7, 39.0, 21.9, 20.8, 11.5, 11.1, –17.0 ppm. MS (ESI): *m/z* = 649 [M + H]⁺.

(*S*)-*N*¹-(4,4-Diiodo-3-oxo-1-phenylbutan-2-yl)-*N*³,*N*³-dipropylisophthalamide (12): To a solution of β-diiodoalcohol **11** (94 mg, 0.14 mmol) in DMSO (5 mL) was added IBX (78 mg, 0.28 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 15 h. The reaction mixture was quenched with water (50 mL) and MTBE (methyl *tert*-butyl ether) (70 mL) was added. The precipitate was filtered off, and the organic layer were extracted with water (2 × 50 mL), dried with Na₂SO₄, and concentrated in vacuo. The crude product was purified by LC [cyclohexane (CH)/ethyl acetate (EE), 1:1] to give β-diiodoketone **12** (86 mg, 91%) as a yellow solid. *R*_f (CH/EE, 1:1) = 0.68. HPLC: *t*_R = 8.26 min (95%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.75–7.64 (m, 2 H), 7.47–7.38 (m, 2 H), 7.35–7.24 (m, 5 H), 7.13 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 5.68 (s, 1 H), 5.46 (q, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 3.55–3.38 (m, 2 H), 3.24 (dd, *J* = 7.2, 1.4 Hz, 2 H), 3.18–3.03 (m, 2 H), 1.82–1.61 (m, 2 H), 1.60–1.41 (m, 2 H), 1.06–0.89 (m, 3 H), 0.83–0.61 (m, 3 H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 195.9, 170.8, 166.5, 137.6, 135.7, 133.6, 129.9, 129.2, 129.1, 128.9, 127.9, 127.5, 125.2, 53.3, 50.8, 46.6, 38.9, 21.9, 20.8, 11.5, 11.1, –26.2 ppm. MS (EI): *m/z* = 647 [M + Na]⁺.

(*S*)-*N*¹-[2-Phenyl-1-(quinoxalin-2-yl)ethyl]-*N*³,*N*³-dipropylisophthalamide (14): β-Diiodoketone **12** (65 mg, 0.11 mmol) was dissolved in DMSO (2.5 mL) and stirred at 60 °C for 2 d (HPLC control). Glacial acetic acid (1.0 mL) and a solution of *o*-phenylenediamine (12 mg, 0.11 mmol) in EtOH (2.0 mL) was added to the reaction mixture, which was stirred at 90 °C for 1 h. After cooling, water (10 mL) was added, and the mixture was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 15 mL). The combined organic layer was washed with water (2 × 30 mL), dried with Na₂SO₄, and concentrated in vacuo. The crude product was purified by LC (EE/CH, 1:2) to give compound

14 (22 mg, 45%) as a brown solid. R_f (CH/EE, 1:1) = 0.38. HPLC: t_R = 7.61 min (96%); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.51 (s, 1 H), 8.17–8.08 (m, 2 H), 7.85–7.73 (m, 4 H), 7.60–7.45 (m, 3 H), 7.42–7.35 (m, 1 H), 7.21–7.16 (m, 2 H), 7.43–7.35 (m, 2 H), 5.80 (td, J = 7.9, 5.8 Hz, 1 H), 3.54 (dd, J = 13.4, 5.7 Hz, 1 H), 3.51–3.42 (m, 2 H), 3.30 (dd, J = 13.4, 8.2 Hz, 1 H), 3.24–3.09 (m, 2 H), 1.87–1.48 (m, 4 H), 1.01–0.89 (m, 3 H), 0.84–0.65 (m, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 169.8, 165.3, 153.1, 143.6, 142.2, 141.9, 137.9, 136.1, 134.6, 130.7, 130.1, 129.5, 129.3, 129.2, 128.9, 128.8, 128.6, 127.8, 127.1, 125.2, 54.1, 46.5, 42.2, 21.9, 20.7, 11.5, 11.1 ppm. MS (EI): m/z = 480 $[\text{M}]^+$. HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ 480.2526; found 480.2486.

Benzyl (2S)-1-[(2S)-1-[(3S)-2-Hydroxy-1,1-diiodo-5-methylhexan-3-ylamino]-4-methyl-1-oxopentan-2-ylamino]-4-methyl-1-oxopentan-2-ylcarbamate (16): $i\text{PrMgCl}$ (2.0 M in THF, 1.05 mL, 2.11 mmol) was added dropwise to a solution of iodoform (829 mg, 2.11 mmol) in THF (10 mL, abs.) at -78°C under an argon atmosphere. A solution of aldehyde **15** (200 mg, 0.42 mmol) in THF (1 mL, abs.) was added, and the resulting mixture was stirred at the same temperature for 15 min and at 0°C for 1 h. The mixture was quenched with aqueous NH_4Cl (10 mL, sat.) and extracted with CH_2Cl_2 (3×20 mL). The combined organic layer was dried with Na_2SO_4 and concentrated in vacuo. The crude product was purified by LC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 20:1) to give peptidic β -diiodoalcohol **16** (249 mg, 80%) as a yellow solid. R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 20:1) = 0.60. HPLC: t_R = 8.30 min (9%), 8.60 min (70%). Diastereomeric mixture: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.38–7.31 (m, 5 H, H^{phenyl}), 6.95–6.92 (m, 1 H, NH), 6.72 (d, J = 6.5 Hz, 1 H, NH), 5.53 (d, J = 7.3 Hz, 1 H, NH), 5.04 (m, 2 H), 4.95 (d, J = 8.3 Hz, 1 H), 4.40–4.35 (m, 2 H), 4.13 (m, 1 H), 3.61–3.59 (m, 1 H), 1.86 (s, OH), 1.56–1.18 (m, 9 H), 0.94–0.83 (m, 18 H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 172.7, 127.6, 156.4, 136.0, 128.6, 128.3, 128.1, 79.1, 78.9, 67.4, 67.3, 53.8, 52.4, 52.1, 49.2, 41.6, 41.3, 40.6, 40.5, 25.0, 24.8, 24.7, 22.9, 22.9, 22.7, 22.4, 22.1, 21.4, -16.5 ppm. MS (ESI): m/z = 766 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Benzyl (S)-1-[(S)-1-[(S)-1,1-Diiodo-5-methyl-2-oxohexan-3-ylamino]-4-methyl-1-oxopentan-2-ylamino]-4-methyl-1-oxopentan-2-ylcarbamate (17): To a solution of β -diiodoalcohol **16** (60 mg, 0.08 mmol) in DMSO (5 mL) was added IBX (45 mg, 0.16 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 15 h. The reaction mixture was quenched with water (50 mL) and MTBE (70 mL) was added. The precipitate was filtered off, and the organic layer was extracted with water (2×50 mL), dried with Na_2SO_4 , and concentrated in vacuo. The crude product was purified by LC (CH/EE, 1:1) to give peptidic β -diiodoketone **17** (52 mg, 87%) as a yellow solid. HPLC: t_R = 8.90 min (70%), 9.18 min (20%). Diastereomeric mixture: ^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.37–7.31 (m, 6 H), 5.19–5.02 (m, 2 H), 5.00–4.88 (m, 1 H), 4.49–4.28 (m, 2 H), 4.27–4.00 (m, 1 H), 1.81–1.51 (m, 9 H), 1.05–0.80 (m, 18 H) ppm. ^{13}C -NMR (125 MHz, MeOD): δ = 199.4, 199.1, 175.4, 175.3, 174.7, 158.6, 138.2, 129.5, 129.0, 128.8, 67.7, 55.4, 55.2, 54.9, 53.1, 51.3, 42.5, 42.1, 42.0, 41.7, 41.5, 41.2, 26.1, 26.0, 25.9, 25.7, 25.2, 23.7, 23.6, 23.5, 23.4, -29.2 ppm.

Benzyl (S)-4-Methyl-1-[(S)-4-methyl-1-[(S)-3-methyl-1-(quinoxalin-2-yl)butylamino]-1-oxopentan-2-ylamino]-1-oxopentan-2-ylcarbamate (19): β -Diiodoketone **17** (80 mg, 0.11 mmol) was dissolved in DMSO (2.5 mL) and stirred at 50°C for 24 h (HPLC control). Glacial acetic acid (1.0 mL) and a solution of *o*-phenylenediamine (12 mg, 0.11 mmol) in EtOH (2.0 mL) was added to the reaction mixture, which was stirred at 70°C for 1 h. After cooling, water

(10 mL) was added, and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (2×15 mL). The combined organic layer was washed with water (2×30 mL), dried with Na_2SO_4 , and concentrated in vacuo. The crude product was purified by LC (EE/CH, 1:2) to give compound **19** (51 mg, 82%) as a yellow solid. R_f (EE/CH = 1:2) = 0.21. HPLC: t_R = 8.301 min (95%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.83 (s, 1 H), 8.11–8.07 (m, 1 H), 8.06–8.04 (m, 1 H), 7.79–7.70 (m, 2 H), 7.38–7.26 (m, 5 H, H^{phenyl}), 7.14 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, NH), 6.53 (d, J = 7.3 Hz, 1 H, NH), 5.45–5.31 (m, 1 H), 5.26 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, NH), 5.11 (s, 2 H), 4.61–4.44 (m, 1 H), 4.23–4.01 (m, 1 H), 1.94–1.45 (m, 9 H), 1.05–0.86 (m, 18 H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 172.7, 171.2, 156.3, 156.0, 144.4, 142.0, 141.8, 136.1, 130.2, 129.7, 129.3, 129.0, 128.6, 128.3, 128.1, 67.2, 53.6, 51.9, 51.1, 45.2, 41.4, 40.9, 29.7, 25.0, 24.7, 23.0, 22.9, 22.8, 22.7, 22.3, 22.2, 22.0 ppm. MS (EI): m/z = 575 $[\text{M}]^+$. HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}]^+$ 575.3472; found 575.3382.

Supporting Information (see footnote on the first page of this article): Copies of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra.

- [1] a) D. Bandyopadhyay, S. Mukherjee, R. R. Rodriguez, B. K. Banik, *Molecules* **2010**, *15*, 4207–4212; b) L. L. Gozalishvili, T. V. Beryozkina, I. V. Omelchenko, R. I. Zubatyuk, O. V. Shishkin, N. N. Kolos, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8759–8765; c) E. Grovenstein Jr., W. Postman, J. W. Taylor, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 68–73; d) N. N. Kolos, L. L. Gozalishvili, E. N. Sivokon, I. V. Knyazeva, *Russ. J. Org. Chem.* **2009**, *45*, 119–125; e) preparation of phenazine- and quinoxaline-substituted amino acids and polypeptides and their diagnostic and therapeutic uses: Z. Miao, WO 2008/083346 A1, **2008**; f) J. S. Yadav, B. V. S. Reddy, K. Premalatha, K. S. Shankar, *Synthesis* **2008**, 3787–3792.
- [2] M. A. Gräwert, N. Gallastegui, M. Stein, B. Schmidt, P.-M. Kloetzel, R. Huber, M. Groll, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 563–566; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 542–544.
- [3] a) P. Darkins, N. McCarthy, M. A. McKerver, T. Ye, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1222–1223; b) P. Darkins, M. Groarke, M. A. McKerver, H. M. Moncrieff, N. McCarthy, M. Nieuwenhuysen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 381–389; c) B. Walker, J. F. Lynas, M. A. Meighan, D. Bromme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *275*, 401–405.
- [4] a) A. El-Dahshan, S. Nazir, Ahsanullah, F. L. Ansari, J. Rademann, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 730–739; b) A. El-Dahshan, S. Weik, J. Rademann, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 949–952; c) S. Weik, J. Rademann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2595; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2491–2494.
- [5] a) J. M. Concellon, P. L. Bernad, J. A. Perez-Andres, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1409–1412; b) J. M. Concellon, H. Rodriguez-Solla, E. Bardales, M. Huerta, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1775–1778.
- [6] G. Yin, B. Zhou, X. Meng, A. Wu, Y. Pan, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2245–2248.
- [7] W. Li, J. Li, D. DeVincentis, T. S. Mansour, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1071–1074.
- [8] H. A. Braun, R. Meusinger, B. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2551–2554.
- [9] M. Frigerio, M. Santagostino, S. Sputore, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537–4538.
- [10] a) A. Duschek, S. F. Kirsch, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1562–1590; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1524–1552; b) H. A. Braun, S. Umbreen, M. Groll, U. Kuckelkorn, I. Mlynarczyk, M. E. Wigand, I. Drung, P.-M. Kloetzel, B. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28394–28401.
- [11] A. Ozanne, L. Pouysegue, D. Depernet, B. Francois, S. Quideau, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2903–2906.

Received: December 21, 2011
Published Online: January 24, 2012

3.6 20S-Proteasom-Inhibitoren

Eine Reihe von α -Ketoamiden wurde von Braun et al. synthetisiert und auf ihre Aktivität bezüglich des 20S-Proteasoms getestet.^[181] Aufgrund der vielversprechenden Aktivität des α -Ketoamides **BSc2189** ($IC_{50} = 0.072 \mu M$) und der noch nicht veröffentlichten strukturellen Informationen bezüglich der Wechselwirkungen des Inhibitors mit der S_1' Bindungstasche im Kokristall mit dem Proteasom wurde in Anlehnung an Braun et al. ein weiteres α -Ketoamid **91** mit einem Bromatom in *para*-Position des P_1' verlängernden Phenylrestes synthetisiert. Durch die hohe Elektronendichte eines Brom-Atoms könnte diese Verbindung als X-Ray Sonde exklusive Strukturinformationen zur S_1' -Kavität liefern. Die Besetzung der S' -Taschen könnte mit einer Steigerung der Aktivität verbunden sein, was zu einer Verkürzung der peptidischen Struktur und somit der P-Seite zur Folge hätte. Zudem könnte auch ein positiver Einfluss auf die Lipophilie und auf die Zellpermeabilität erreicht werden.

Die Synthese von Verbindung **91** wurde auf die Sequenz des geschützten Dipeptids Z-Leu-Leu **87** aufgebaut. Zunächst wird Z-Leu-Leu über EDAC / HOBt in DMF mit *L*-Leucinol zum Alkohol **88** umgesetzt. Dieser wird im nächsten Schritt mit IBX in sehr guten Ausbeuten zu dem Keton **89** (**MG132**) oxidiert. Das Keton **89** wird mit dem Isonitril **93** in einer mehrtägigen Passerini-Reaktion in Gegenwart von Trifluoressigsäure und Pyridin zu dem α -Hydroxyamid **90** umgesetzt. Die anschließende Oxidation des α -Hydroxyamids **90** mit IBX liefert das gewünschte α -Ketoamid **91** in 53%iger Ausbeute (Abb. 45).

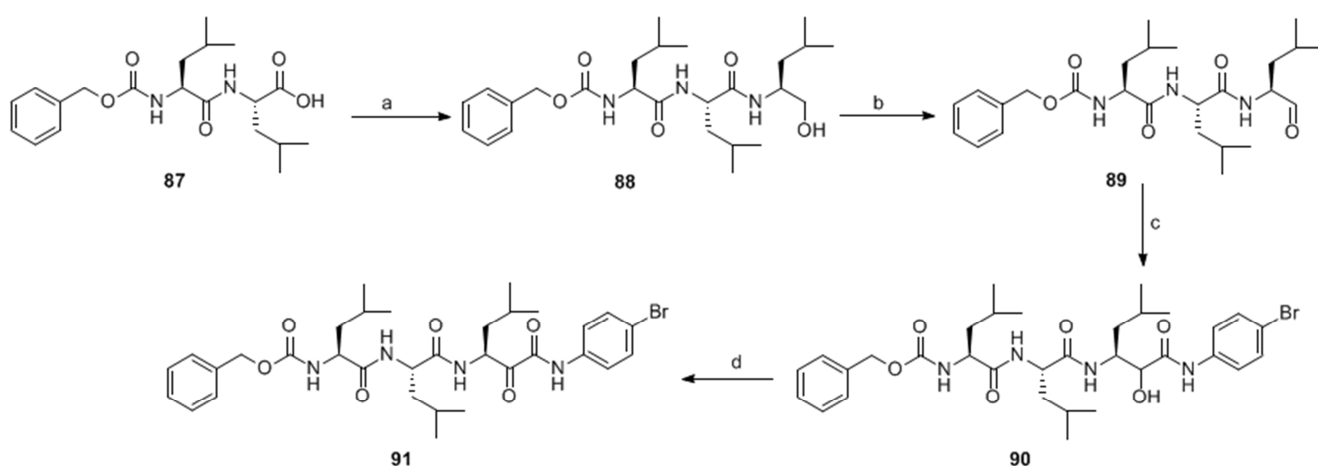


Abb. 45: Synthese von peptidischem α -Ketoamid **91**. Reagenzien und Bedingungen: a) *L*-Leucinol, EDAC, HOBt, DMF, b) IBX, DMSO, 19 h, RT, %, c) i) Pyridin, **93**, DCM, ii) Trifluoressigsäure, 77 %, d) IBX, DMSO, RT, 53%.

Das für die Passerini-Reaktion benötigte 1-Brom-4-isocyanobenzol (**93**) wird aus dem entsprechenden *p*-Bromformanilid (**92**) mit $POCl_3$ nach einer Vorschrift von Janza et al.^[182] generiert (Abb. 46).

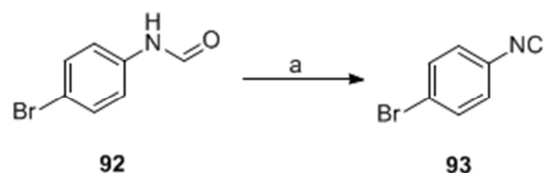


Abb. 46: Synthese von 1-Brom-4-isocyanobenzol **93**. Reagenzien und Bedingungen: a) DIPA, POCl₃, DCM, 0°C-RT, 3.5 h, 56%.

α -Ketoamid **91** (**BSc4503**) wurde auf seine inhibitorische Wirkung bezüglich des 20S-Proteasoms getestet. Die Messungen der Aktivitäten ergaben, dass bei einer 500 μ M Inhibitorkonzentration 33% chymotryptische Restaktivität vorhanden bleibt. Trypsin- und caspaseartige Aktivitäten werden von **91** nicht inhibiert. Der IC₅₀ Wert beträgt 300 nM (Daten noch nicht veröffentlicht).

Da die Messungen und die Kokristallisation von **91** mit dem 20S-Proteasom zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen sind, bleiben die Ergebnisse abzuwarten.

3.7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Vielzahl von potentiellen β -Sekretase-Inhibitoren und γ -Sekretase-Modulatoren sowie Proteasom-Inhibitoren synthetisiert werden. Zu diesem Zweck wurde auf etablierte Synthesestrategien zurückgegriffen oder es wurden bestehende Synthesemethoden variiert. Des Weiteren wurde eine neue effiziente Synthesemethode für peptidische α -Ketoaldehyde, die als Proteasom-Inhibitoren Anwendung finden, entwickelt.

BACE1-Inhibitoren: Es wurden eine Reihe von (*S*)-konfigurierten Hydroxyethylaminderivate über 2-Iodoethanol Intermediate synthetisiert. Die Synthese des *N*-substituierten Indols **26** als Ersatz zu den von Stachel und Coburn bekannten Inhibitoren liefert einen BACE1 Inhibitor, der im mikromolaren Bereich aktiv ist. Er weist eine ähnliche Aktivität wie die Isophthalamid-Derivate auf, jedoch eine ungefähr 1000-fach stagnierende Aktivität im Vergleich zu den bisher bekannten BACE1-Inhibitoren.

γ -Sekretase-Modulatoren. Auf der Basis des Carbazolgründgerüsts wurden γ -Sekretase-Modulatoren synthetisiert. Unter Beibehaltung des lipophilen Restes am Carbazol-Stickstoff wurde die Carbonsäurefunktion durch Carbonsäureisostere ausgetauscht. Die chemische Variation der Säurefunktionalität gab Hinweise auf Struktur-Aktivitäts-Beziehungen. Entscheidend für die γ -Sekretase-Modulation ist die Notwendigkeit eines aziden H-Atoms wie es in der normalen Carbonsäure sowie in den Tetram- und Tetronsäuren zu finden ist. Die Verlängerung der Carbonsäure um eine weitere CH₂-Gruppe sowie die Einführung einer weiteren Carbonsäure in Position 3 des Carbazols führten zu einem Aktivitätsverlust.

Mit der Synthese von Bepridil-abgeleiteten Derivaten gelang es, die inverse zur normalen Modulation umzukehren. Die Einführung einer Carbonsäurefunktion anstelle der *iso*-Butyl-Gruppe unter Beibehaltung des aromatischen Gerüsts, welche Membraninsertion gewährleistet, führt zur Reduktion der A β 42- und Erhöhung der A β 38-Konzentration. Die biologischen Daten zeigen gegenüber der γ -Sekretase jedoch nur moderate Aktivitäten. Überraschenderweise ist das Bepridil-Derivat **14** inaktiv bezüglich einer γ -Sekretase-Inhibition, obwohl es eine Carbonsäurefunktion enthält. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Verbindung aufgrund des zusätzlichen Stickstoffs nicht mehr zellpermeabel ist.

Zur Identifizierung der γ -Sekretase-Bindungsstelle wurde ein photoreaktives biotinyliertes Carbazol-Derivat mit einem geringeren Abstand ($<10 \text{ \AA}$) zwischen der vermeintlichen Interaktionsstelle (Carbonsäure) und der photoreaktiven Gruppe (Azid) synthetisiert. Aufgrund des Aktivitätsverlustes des

photoreaktiven biotinylierten Carbazol-Derivats **62** ist es nicht möglich Markierungsexperimente bezüglich der γ -Sekretase Bindungsstelle durchzuführen. Aktivitätsstudien deuten darauf hin, dass der Aktivitätsverlust der für Markierungsexperimente geeigneten GSMs mit der Kupplung des Biotins an das Carbazol zusammen hängt. Die Aktivität der entsprechenden GSM ist nach Kupplung des Biotins um ein 4-5 faches erniedrigt.

Proteasom-Inhibitoren. Basierend auf den Vorarbeiten von Braun et al. wurde ein potentieller tripeptidischer α -Ketoamid Proteasom-Inhibitor **91 (BSc4503)** mit einer Verlängerung des Phenylrestes (P_1'), entwickelt, der in Kristallisation mit dem 20S-Proteasom neue Erkenntnisse über die S' -Bindungstaschen liefern soll.

α -Ketoaldehyde. Es wurde eine einfache und milde Syntheseroute für α -Ketoaldehyde, ausgehend von benzyllischen Aldehyden, entwickelt, die in diesem Umfang und unter Verwendung von geminalen Iodiden noch nicht beschrieben wurde. Die Synthese umfasst drei Stufen und beginnt mit der Umsetzung des Aldehydes zum β -Diodalkohol, gefolgt von der Oxidation zum β -Diodketon und der anschließenden Umsetzung unter Sauerstofftransfer mittels DMSO zum α -Ketoaldehyd. Dabei konnte die Reaktionsfolge auch auf die Synthese peptidischer und semi-peptidischer α -Ketoaldehyde ausgeweitet werden, die bei der Inhibition des Proteasoms eine wichtige Rolle spielen.

3.8 Ausblick

Aus den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen ergeben sich für Protease-Inhibitoren und Modulatoren weitere Entwicklungsmöglichkeiten.

BACE1-Inhibitoren und γ -Sekretase-Modulatoren. Da die biologischen Daten der synthetisierten BACE1-Inhibitoren eine moderate Aktivität gegenüber BACE1 aufwiesen, jedoch geringer als erwartet sind, erscheint es wenig sinnvoll diese Substanzklasse weiter zu verfolgen.

Die Synthese einer Anzahl von GSMs mit einem Carbazol als Grundgerüst hat gezeigt, dass der lipophile Rest am Carbazol-Stickstoff und die Carbonsäurefunktion der Seitenkette essentiell für die Aktivität der γ -Sekretase Modulatoren sind. Basierend auf diesen Ergebnissen können weitere Derivate als GSMs synthetisiert werden, indem das Carbazolgrundgerüst z.B. durch ein 9,10-Dihydroakridin (**94**) oder ein Iminodibenzyl (**95**) ausgetauscht wird. Die Ringvergrößerung sowie der Einbau weiterer Heteroatomen wie bei Phenothiazin (**96**) würden Rückschlüsse auf die geometrische Anordnung der Substituenten, der Carbonsäure und des lipophilen Restes, zulassen (Abb. 47).

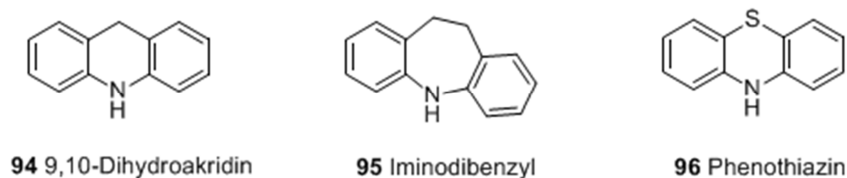


Abb. 47: Mögliche Grundgerüste für Derivatisierungen der GSMs.

Durch Derivatisierung des Bepridils ist es gelungen, die inverse Modulation in eine normale Modulation umzukehren. Die biologischen Daten zeigten jedoch nur moderate Aktivitäten bezüglich der γ -Sekretase, so dass es auch hier wenig Sinn macht diese Strukturklasse weiter zu verfolgen.

Der hohe Aktivitätsverlust des photoreaktiven biotinylierten Carbazol-Derivats **62**, bedingt durch die Kupplung des Biotins, macht es leider nicht möglich Markierungsexperimente bezüglich der γ -Sekretase-Bindungsstelle durchzuführen.

Daher würde es sich als sinnvoll erweisen, einen photoreaktiven GSM ohne Biotin zu synthetisieren, jedoch unter Beibehaltung des lipophilen Restes am Carbazol (Abb. 48). Nach erfolgter Markierung könnten die Proteinwechselwirkungen entweder massenspektrometrisch oder über Neutronenbeugung untersucht werden.

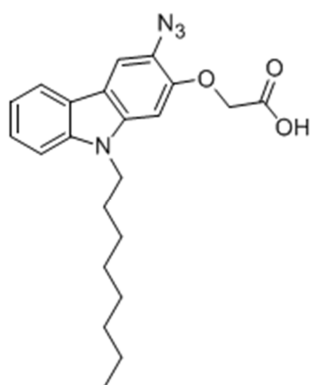


Abb. 48: Beispiel für einen photoreaktiven GSM für Markierungsexperimente.

Proteasom-Inhibitoren. Die Entwicklung von 20S-Proteasom-Inhibitoren mit neuen Strukturmotiven ist vielversprechend. Die bisher noch unveröffentlichten Strukturen des 20S-Proteasomkomplexes mit **BSc2189** und **91 (BSc4503)** bieten exklusive Informationen zur S₁'-Bindungstasche, die zur Entwicklung von optimierten nicht-peptidischen Proteasom-Inhibitoren genutzt werden können, besonders in der Verlängerung der P'-Seite. Des Weiteren stellt der Bromsubstituent von Verbindung **91 (BSc4503)** Derivatisierungsmöglichkeiten zur Verlängerung der P'-Seite dar.

Auf der für α -Ketoaldehyde neu entwickelten Syntheseroute aufbauend könnten durch Variation des Peptidrestes, zum einen weitere peptidische oder semi-peptidische α -Ketoaldehyde als 20S-Proteasom Inhibitoren entwickelt werden, zum anderen ermöglicht der Aldehyd aufgrund seiner hohen Reaktivität zahlreiche Derivatisierungsmöglichkeiten, so dass neue Strukturklassen als potentielle Proteasom-Inhibitoren entwickelt werden können.

Eine weitere Möglichkeit von Proteasom-Inhibitoren besteht in der Synthese von neuen Verbindungsklassen die z.B. einen Methylacetoacetat-Rest (**97**) oder einen Isocoumarin (**98**) tragen. Diese können ähnlich wie α -Ketoaldehyde in einer zweistufigen Reaktion mit der Hydroxygruppe und mit der N-terminalen Aminogruppe des Threonins eine Bindung über einen 7- bzw. 8-gliedrigen Ring eingehen (Abb. 49).

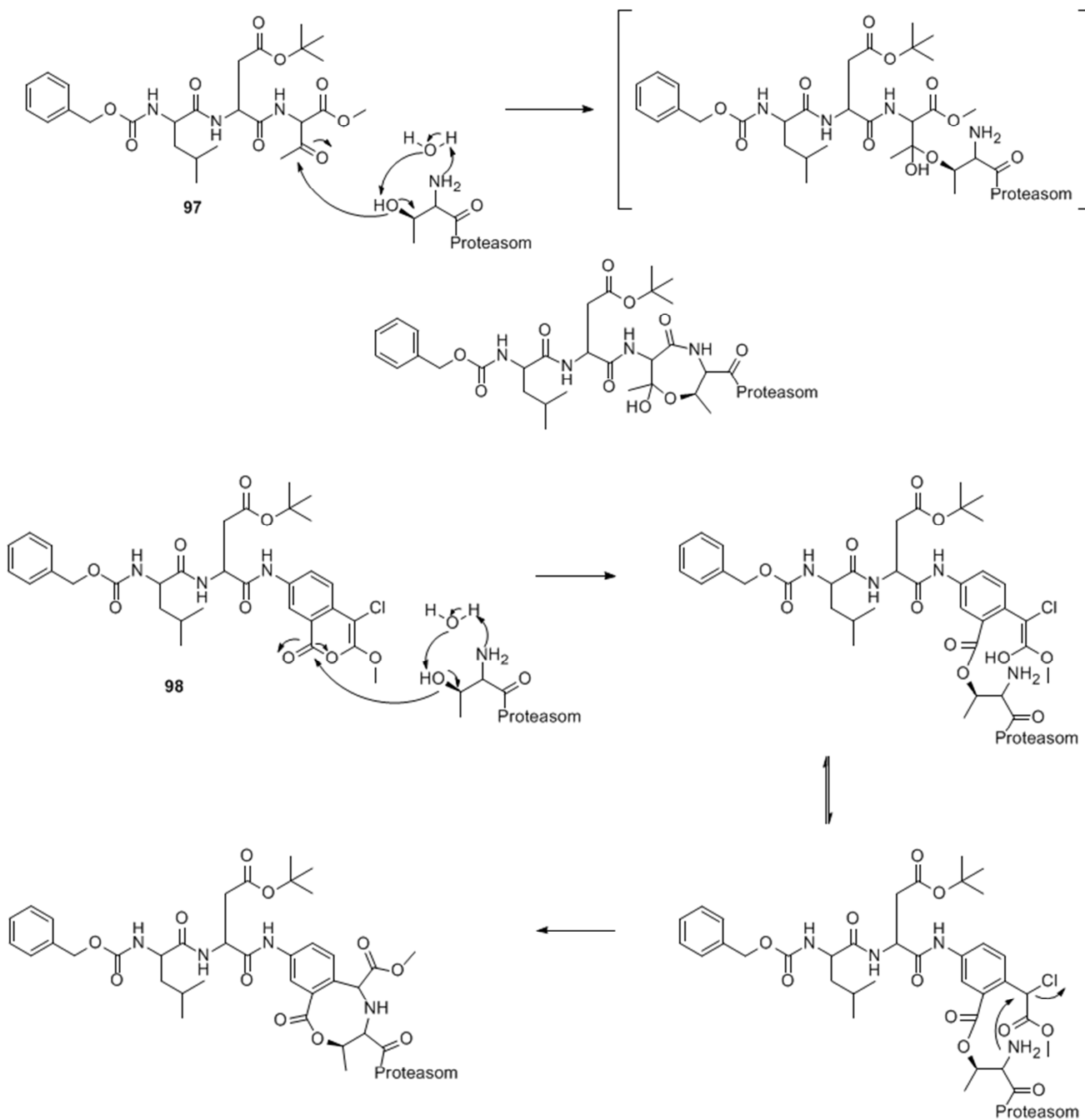


Abb. 49: Beispiele für neue Strukturklassen **97**, **98** als Proteasom-Inhibitoren sowie die Wechselwirkung der Inhibitoren mit dem katalytischen Threonin am Proteasom.